

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA

BIOCATALISI APPLICATA E MICROBIOLOGIA INDUSTRIALE

Ciclo XX°

Settore scientifico disciplinare di afferenza:
Chimica delle Fermentazioni e Biotecnologia Industriale (CHIM 11)

TITOLO TESI

**PROCESSI DI *BIOREFINING* PER L'ESTRAZIONE DI
SECONDARY CHEMICAL BUILDING BLOCKS
DA SOTTOPROTTI DELL'AGRO-INDUSTRIA**

Presentata da: Dott. Dario Zanichelli

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Diego Matteuzzi

Prof. Leonardo Setti

Esame finale anno 2008

SOMMARIO

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. Fonti rinnovabili di materie prime per l'industria chimica di sintesi.....	1
<i>Primary e secondary chemical building blocks</i>	4
<i>Biofenoli come secondary chemical building blocks da fonti rinnovabili</i>	7
1.2. La parete cellulare vegetale.....	11
<i>Funzioni e costituenti polisaccaridici</i>	11
<i>Costituenti non polisaccaridici: glicoproteine e lignina</i>	15
<i>Monocotiledoni e dicotiledoni</i>	16
1.3 Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali.....	20
<i>Cellulasi</i>	21
<i>Emicellulasi</i>	21
<i>Pectinasi</i>	22
<i>Amilasi</i>	23
<i>Proteasi</i>	25
1.4. Struttura e trasformazione del grano duro.....	27
<i>Carboidrati</i>	29
<i>Carboidrati strutturali: cellulosa e pentosani</i>	31
<i>Lipidi</i>	34
<i>Proteine</i>	35
<i>Minerali e vitamine</i>	37
<i>La molitura</i>	38
<i>La crusca</i>	40
1.5. L'acido ferulico	46
<i>Attività antiossidante</i>	48
<i>Attività antimicrobica</i>	49
<i>Protezione dai raggi UV ed assorbimento cutaneo</i>	49
<i>Fertilità</i>	49
<i>Circolazione e ipertensione</i>	50
<i>Effetti antinfiammatori</i>	50
1.6. Il concetto di bioraffineria come valorizzazione integrata per il recupero di chemicals ed energia	51
<i>Dalla valorizzazione di filiera alla bioraffineria</i>	51
<i>L'approccio tecnologico come soluzione alle limitazioni logistiche</i>	54
2. SCOPO DELLA RICERCA.....	59
3. MATERIALI E METODI	60
3.1. Determinazione dell'umidità nella crusca di grano.....	60
3.2. Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solfonico)	60
3.3. Determinazione dei pentosani (metodo del floroglucinolo).....	62
3.3. Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)	64
3.4. Determinazione delle attività enzimatiche	66
<i>Attività α-amilasica</i>	66
<i>Attività xilanasica</i>	67
<i>Attività glucosidasica</i>	68
<i>Attività cinnamolo esterasica</i>	69
<i>Attività laccasica</i>	70
3.5. Determinazione delle proteine totali (Metodo di Bradford).....	72

3.6. Determinazione spettrofotometrica dei polifenoli totali (Metodo di Folin-Ciocalteu).....	72
3.7. Determinazione del potere antiossidante totale.....	74
3.8. Determinazione del contenuto in acido ferulico degli idrolizzati enzimatici tramite HPLC	74
3.9. Preparazione della resina e processo di adsorbimento e desorbimento.....	76
3.10. Determinazione del contenuto di lignina.....	76
4. RISULTATI E DISCUSSIONE.....	78
4.1. Prove preliminari di idrolisi della crusca di grano	78
<i>Idrolisi chimica della crusca di grano</i>	78
<i>Idrolisi enzimatica della crusca di grano</i>	83
<i>Contenuto in biofenoli degli idrolizzati di crusca: prove preliminari</i>	94
4.2. Studio di biocatalizzatori commerciali per l'idrolisi enzimatica della crusca	96
<i>Caratterizzazione dei preparati enzimatici commerciali</i>	96
<i>Efficacia dei biocatalizzatori nel rilascio di acido ferulico da crusca</i>	103
<i>Utilizzo simultaneo di diversi preparati enzimatici commerciali</i>	104
<i>Bilanci di materia preliminari del processo di idrolisi enzimatica della crusca</i>	109
4.3. Processi di estrazione della componente fenolica tramite tecnologie di adsorbimento e desorbimento su resina.....	113
<i>Sistema modello: acido ferulico in tampone</i>	114
<i>Sistema modello: acido ferulico in soluzione di amido</i>	116
<i>Sistema reale: prove preliminari</i>	117
<i>Estrazione di acido ferulico tramite un processo di adsorbimento/desorbimento su resina</i>	120
4.4. Produzione di biovanillina da idrolizzati di crusca contenenti acido ferulico libero.....	123
<i>Bioconversione di acido ferulico commerciale</i>	124
<i>Bioconversione dell' acido ferulico contenuto negli idrolizzati enzimatici di crusca</i>	125
<i>Bioconversione dell' acido ferulico contenuto in estratti concentrati ottenuti tramite estrazione con resina IRA 95 da idrolizzati enzimatici di crusca</i> ...	127
5. CONCLUSIONI.....	129
6. SVILUPPI FUTURI	133
7. BIBLIOGRAFIA.....	134

1. INTRODIZIONE

1.1. Fonti rinnovabili di materie prime per l'industria chimica di sintesi

Lo sviluppo tecnologico e industriale degli ultimi decenni ha portato la società occidentale ad un relativo grado di benessere che però si paga in termini di consumo energetico e produzione di enormi quantità di rifiuti. Poiché la crescita della domanda energetica non accenna ad arrestarsi (soprattutto da parte dei paesi in via di sviluppo), ci troviamo di fronte a un serio pericolo riguardo all'esaurimento delle risorse non rinnovabili e a un irreversibile danno causato all'ambiente.

Il problema delle risorse energetiche, della loro gestione e dell'impatto ambientale dei processi industriali è un argomento sempre più pressante a cui occorre trovare una soluzione in tempi abbastanza brevi. L'assottigliamento delle riserve delle risorse non rinnovabili quali petrolio e gas è ormai all'attenzione del grande pubblico e viene costantemente sottolineato dai media. Il superamento della soglia psicologica dei 100 \$ al barile del greggio anche sui mercati occidentali così come le tensioni geopolitiche internazionali correlate alla distribuzione del gas naturale, sono evidenti segnali del fatto che il problema energetico segnerà probabilmente la storia del XXI° secolo.

Al giorno d'oggi la maggior parte dell'energia prodotta proviene da fonti non rinnovabili come il petrolio, il gas naturale e il carbone fossile.

1. Introduzione

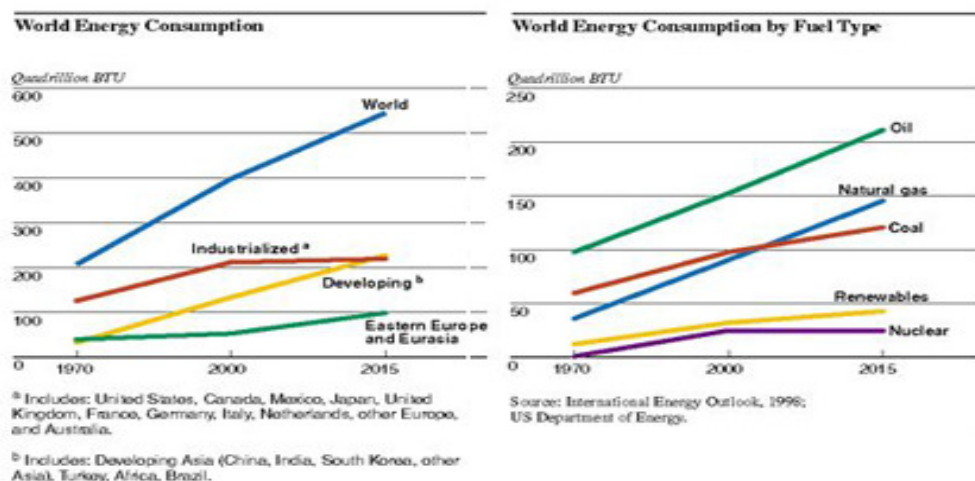


Figura 1.1.: Consumo energetico mondiale (1970-2015) e consumo energetico per tipo di combustibile

Al fine di rispondere alle problematiche correlate al crescente fabbisogno energetico mondiale si stanno mettendo in pratica, soprattutto in occidente, politiche volte alla riduzione dei consumi tramite risparmio energetico e al reperimento di fonti alternative rinnovabili anche grazie a forti investimenti in ricerca sia sul versante accademico che su quello industriale.

Negli ultimi anni si sta investendo non solo nelle ormai tradizionali energie rinnovabili (eolico, solare, geotermico), ma anche nelle tecnologie alternative, nei nuovi carburanti, nell'uso crescente di gas, nel nucleare e in soluzioni ibride elettrico-diesel (in particolare nel campo dell'autotrazione). A questo insieme vanno aggiunte le ultime frontiere, quali il fotovoltaico a basso costo o il termoelettrico.

Il binomio ricerca-sviluppo e la forte spinta industriale hanno consentito di realizzare straordinari progressi. Secondo la International Energy Agency, le fonti rinnovabili potranno arrivare a soddisfare il 20% della richiesta di elettricità mondiale nel 2020, e il 50% della domanda energetica nel 2050.

Dato che oggi i combustibili fossili hanno un costo sempre maggiore e presto tenderanno ad esaurirsi, il risparmio conferisce a chi investe in innovazione una maggiore competitività. Questo ha portato a un incremento dell'attività scientifica, tecnologica e industriale in corso in tutto il pianeta. La Cina, ad esempio, all'inizio dell'anno 2005 ha annunciato un gigantesco piano di

1. Introduzione

costruzione di ben 27 centrali nucleari in 15 anni (oltre al rinnovamento delle sue nove già esistenti)¹.

Nel frattempo, governi come quelli del Canada o del Brasile hanno avviato programmi operativi, altrettanto vasti, sulla produzione di “biofuels”. Il primo sfrutterà le sue eccedenze di cereali, mentre il secondo la sua capacità di trasformare in etanolo lo zucchero di canna, di cui il Brasile è uno dei primi produttori mondiali.

La tecnologia punta quindi su energia prodotta in modo sempre più efficiente e pulito, cioè diminuendo notevolmente il consumo delle materie prime e soprattutto contenendo notevolmente le emissioni. Attualmente oltre l'80% delle emissioni provocate dall'uomo sono causate dall'uso di combustibili fossili; l'attività dell'uomo apporta circa 7 miliardi di ton/anno di CO₂ che si stima potranno essere nel 2020 di circa 12 miliardi di ton/anno².

L'aumento della concentrazione atmosferica di CO₂ da 280 ppm del periodo pre-industriale agli attuali 371 ppm viene ormai considerata come la principale causa del surriscaldamento del globo registrato negli ultimi 50 anni, come riportato nel 2001 dal rapporto dell'Intergovernmental Panel on Climate Change; le disposizioni del Protocollo di Kyoto prevedono che i paesi industrializzati dovrebbero ridurre in media le emissioni di CO₂ del 5,9% rispetto a quelle del 1991, entro la fine del primo periodo 2008-2012.

Per l'Italia, che ha ratificato il protocollo tre anni fa, l'obiettivo di riduzione è del 6,5%, mentre per la UE il target globale è un taglio del 8,2% entro il 2012.

Perché il Protocollo entri in vigore occorre la ratifica di almeno 54 nazioni, la cui produzione di gas serra raggiunga, complessivamente, il 54% delle emissioni mondiali. Con l'adesione, alla fine del 2004, della Russia, responsabile del 17.6% delle emissioni, è stato raggiunto il quorum per rendere il protocollo una legge internazionale vincolante¹.

1. Introduzione

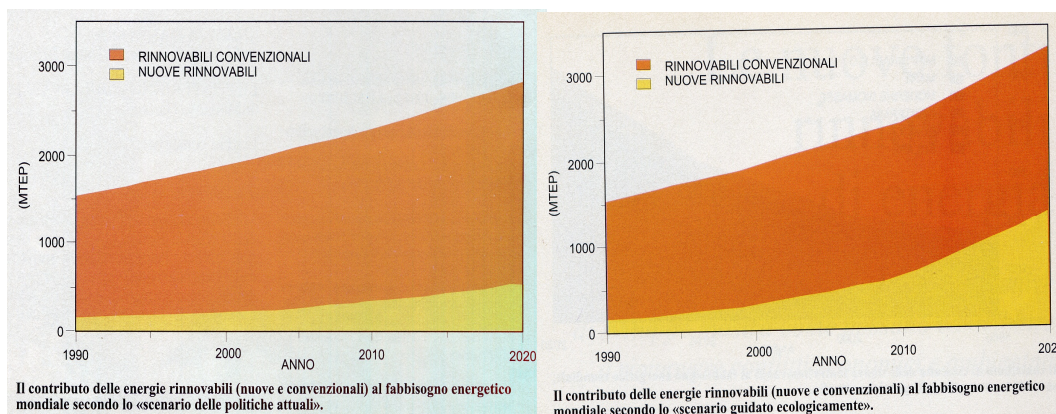


Figura 1.2.: Confronto del contributo delle fonti rinnovabili tra lo scenario di politiche attuali e quello prevedibile dall'applicazione dei principi del protocollo di Kyoto

Meno attenzione è invece dedicata al problema delle materie prime per l'industria, soprattutto di tipo plastico, anch'esse inevitabilmente collegate alle fonti non rinnovabili dalle quali sono ottenute per raffinazione e sintesi.

Primary e secondary chemical building blocks

Vengono definite *chemichal building blocks* quelle molecole di base sulla quale poggia la gran parte della chimica di sintesi, tali molecole hanno un relevantissimo valore strategico per l'industria chimica. Attualmente sono ottenuti dalla raffinazione di idrocarburi fossili (petrolio, carbone e gas naturale), anche se vi è un sempre crescente interesse riguardo di valorizzazione della biomassa verso la produzione di tali molecole. Tale tendenza rappresenta uno degli obiettivi strategici per l'Unione Europea nel medio-lungo termine.

I *primary chemical building blocks* rappresentano prodotti chimici di base per la sintesi di una vasta gamma di componenti per l'industria chimica. Fenolo e cresoli rappresentano un buon esempio di *primary chemical building blocks*, di cui 2,8 milioni di tonnellate sono attualmente prodotti in Europa ogni anno. Consultando il database Sci Finder Scholar si possono trovare più di 30000 reazioni per il fenolo e più di 17000 reazioni per i cresoli. Considerando la componente fenolica contenuta nei sottoprodotti del settore agroalimentare, il

1. Introduzione

potenziale sfruttamento di questi intermedi chimici apre la strada ad un gran numero di applicazioni potenziali, che vanno dai prodotti farmaceutici, ai prodotti fitosanitari, dal settore degli additivi alimentari a quello delle resine.

Attualmente, i *primary chemical building blocks* sono prodotti da processi di raffinazione di idrocarburi fossili: il 5% della produzione mondiale proviene dal carbone (che contiene 0,2% di fenoli), attraverso la distillazione dei residui dopo la produzione di coke, mentre 95 % della produzione mondiale di fenolo si ottiene dall'ossidazione di 1-metiletelbenzene (cumene), che a sua volta è prodotto dalla reazione tra benzene e propene. Sia il benzene e propene sono prodotti tramite cracking e distillazione del petrolio greggio. Il cumene è poi trasformato in fenolo ottenendo acetone come sottoprodotto. Il costo attuale di questi *primary chemical building blocks* è di circa 1-3 € / kg.

I *secondary chemical building blocks* rappresentano derivati chimici medio valore aggiunto, che sono utilizzati come sostanze intermedie per la sintesi di sostanze chimiche ad alto valore. Attualmente, queste molecole sono ottenute attraverso la sintesi da *primary chemical building blocks*. Diversi derivati fenolici di origine naturale come il tirosolo, l'idrossitirosolo, l'acido ferulico, l'acido *p*-cumarico, la catechina, l'acido gallico, l'acido caffeico, l'acido vanillico e la vanillina sono noti come *secondary chemical building blocks*. Sci Finder Schilar riporta più di 300 reazioni per ognuna di queste molecole, per un totale di oltre 4000 reazioni. Questi derivati fenolici sono attualmente utilizzati a decine di migliaia di tonnellate per la produzione di prodotti ad elevato valore aggiunto (figura 1.3.), come gli additivi alimentari e aromi (vanillina³), prodotti della chimica fine (farmaci anti-infiammatori non steroidei come l'ibuprofene o flurbiprofen⁴) e polimeri (poli *p*-vinilfenolo, un polimero fotosensibile per applicazioni elettroniche e optoelettroniche⁵).

1. Introduzione

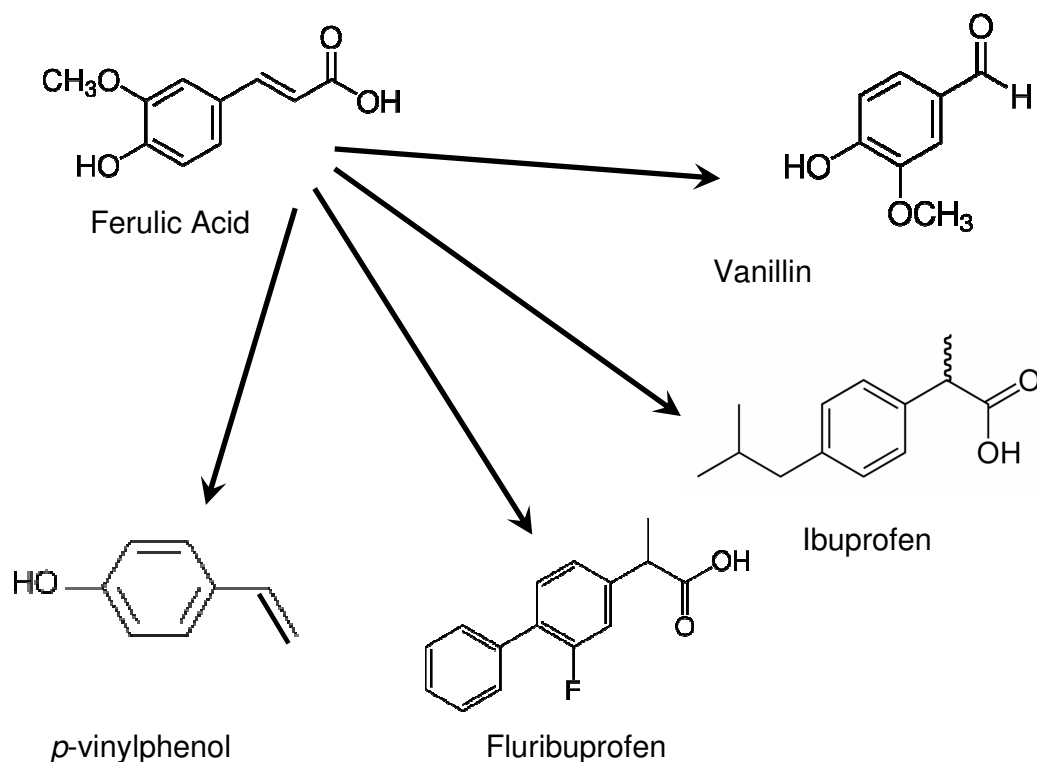


Figura 1.3.: Possibili prodotti di sintesi che utilizzano acido ferulico come *secondary chemical building block*.

Il costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica vanno da 40 € / kg a 60.000 € / kg (tabella 1.1.).

Tabella 1.1: costo attuale dei *secondary chemical building blocks* di derivazione fenolica (quotazioni per forniture bulk Sigma-Aldrich s.p.a)

Product Name (CAS n°)	Cost €/Kg
Vanillin (121-33-5)	40
Vanillic acid (121-34-6)	270
Chlorogenic acid (327-97-9)	35.000
Caffeic acid (331-39-5)	2.300
Epicatechin gallate(1257-08-5)	20.000
Syringic acid (530-57-4)	1.600
Gallic acid (149-91-7)	180
Catechin (154-23-4)	6.000
p-coumaric acid (7400-08-0)	1.800
Ferulic Acid (1135-24-6)	450
Tyrosol (501-94-0)	8.800
Sinapic acid (530-59-6)	60.000

Biofenoli come secondary chemical building blocks da fonti rinnovabili

In natura la biosintesi dei composti fenolici è uno dei tratti distintivi dei metabolismi secondari di piante superiori e felci mentre sono sostanzialmente assente nei microrganismi e nel regno animale. Le biomasse vegetali derivanti dalle trasformazioni agroindustriali, che contengono il 3-8% p/p secco di fenoli, rappresentano una fonte rilevante di *secondary chemical building blocks* attualmente non sfruttate. Le classi di composti fenolici contenuti in queste matrici vegetali sono essenzialmente acidi fenolici, derivati cinnamici, flavonoidi e lignine. Attualmente i sottoprodotti del settore agroalimentare sono usati come materie prime per la produzione di mangimi o smaltiti come rifiuti speciali non pericolosi. In entrambi i casi la frazione fenolica contenuta in esse rappresenta un problema: riduce il potere nutrizionale dei mangimi e ostacola la decomposizione microbiologica negli impianti di trattamento. Come nel caso della produzione di coke, la rimozione del contenuto fenolico da biomasse può costituire una valida via di valorizzazione di tali matrici tramite recupero di sostanze chimiche.

Le biomasse vegetali dervanti dall'agroindustria è in genere composta da cellulosa, emicellulose, lignina, amido, proteine, acidi grassi/trigliceridi, oli essenziali, gomme e altri metaboliti. Molte ricerche sono stati dedicate all'estrazione di composti particolari che hanno diverse potenziali applicazioni anche se molto specifiche. E' stato dimostrato che questo approccio, laddove trovi applicazioni industriali, saturi rapidamente la domanda di mercato e, quindi, non rappresenta una valida soluzione generale per la valorizzazione di tutta la biomasse prodotta. Allo stesso modo, la produzione di biopolimeri ottenuti da amido, cellulosa e proteine è applicabile per applicazioni di nicchia, che hanno bisogno di essere supportata da politiche pubbliche, al fine di sostenere gli investimenti necessari per la produzione come conseguenza della minore qualità rispetto ai prodotti di derivazione petrolchimica.

Il settore agro-alimentare costituisce uno dei comparti produttivi a cui sono attribuite le più elevate produzioni di rifiuti speciali, in massima parte non pericolosi. A livello Europeo gli scarti agricoli si stimano nell'ordine di 250

1. Introduzione

milioni di tonnellate l'anno^{6,7}. I sottoprodotti del settore agroalimentare europeo rappresentano una abbondante fonte di materie prime a basso costo, che non sottraggono territorio e risorse necessarie per la produzione alimentare. Questo consente di ovviare alla necessità per l'Europa di dedicare grandi superfici coltivabili per usi non alimentari a differenza di quanto succede negli Stati Uniti e in Brasile. I sottoprodotti delle diverse catene di produzione agro-alimentare contengono grandi quantità di specifici composti fenolici acidi idrossicinnamici nel settore dei cereali, tirosolo e idrossitirosolo nel settore della produzione dell'olio d'oliva e catechine dalla trasformazione dell'uva, per considerare solo tre delle più importanti catene agro-alimentare in area mediterranea e centro Europa. A livello italiano i cereali costituiscono una produzione per il 2004 di circa 22,1 milioni di ton, la vite di 9 milioni di ton e l'olivo di 4,7 milioni di ton⁸. I residui dalla lavorazione dei cereali costituiscono circa 11 milioni di ton/anno su base secca di cui il 40-60% viene utilizzato come lettiera per animali e per la produzione della carta in vari comparti⁹. Negli altri tre comparti la quantità degli scarti è di rilevante entità e per quanto riguarda la produzione del vino e dell'olio di oliva si possono stimare dei quantitativi di sottoprodotti di lavorazione pari rispettivamente al 30% ed al 27,5%. Questo porta ad una produzione di circa 2,3 milioni di tonnellate l'anno di scarti enologici e 1,2 milioni di tonnellate l'anno di scarti oleari, dei quali solo il 25% viene riutilizzato. La gestione e lo smaltimento di questi scarti è un problema complesso, da affrontare in chiave sociale, economica e ambientale con l'obiettivo di un uso razionale e sostenibile delle risorse.

E' quindi necessaria un'attenta politica di gestione integrata degli scarti agro-industriali indispensabile a garantire la sostenibilità dello smaltimento attraverso varie forme di recupero successive.

Al fine di massimizzare il processo di valorizzazione di tali scarti, ottenendo da un lato un corretto trattamento che abbatta il loro impatto ambientale, dall'altro un ritorno economico che renda sostenibili se non appetibili tali trattamenti, un approccio razionale è necessario. Data la complessità e la diversità delle matrici di partenza, generalmente trattamenti singoli risultano difficili o scarsamente sostenibili.

1. Introduzione

Un diverso approccio, basato su trattamenti sequenziali che consentano la valorizzazione delle diverse componenti della matrice vegetale, sebbene più complesso e oneroso, può consentire di massimizzare il recupero di valore aggiunto dallo scarto, ottimizzando al contempo le procedure di smaltimento. In figura 1.4 è riportato uno schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio di scarti agroindustriali.

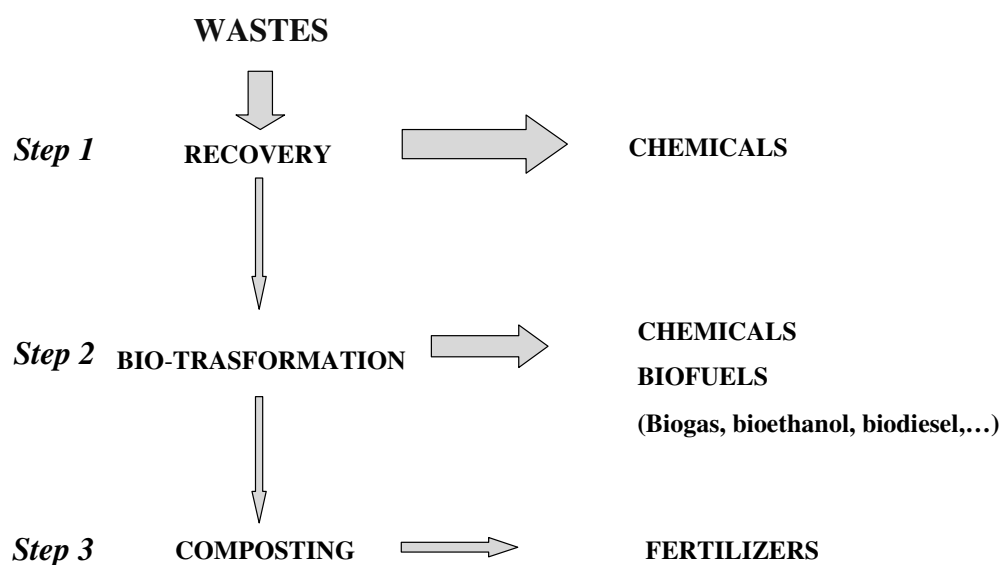


Figura 1.4: schema di approccio metodologico per la valorizzazione multistadio degli scarti agroindustriali.

Gli scarti di origine vegetale sono caratterizzati da specifici fito-composti con attività antiossidante denominati biofenoli, i quali hanno recentemente trovato un grande interesse nel mercato come prodotti antiossidanti. Particolare interesse è legato alla loro applicazione nel mercato dei prodotti per la salute dell'uomo sia come nutraceutici che come cosmetoaceutici e, in prospettiva, anche in campo farmaceutico. Su questa base gli antiossidanti naturali rappresentano un mercato in crescita per lo sviluppo di prodotti *environmetal friendly*.

1. Introduzione

Tabella 1.2: quantità di sottoprodotti delle principali filiere agroalimentari Italiane e contenuto di biofenoli potenzialmente recuperabili da esse ogni anno.

Settore agroalimentare e tipologia di sottoprodotto	Quatità prodotta (Milioni di Ton)	Quantità e principali fenoli recuperabili (Ton)
Produzione di olio d'oliva Acque di vegetazione	4	40.000 oleuropeina idrossitirosolo
Sfarinati di grano duro Crusca	1,7	11.200 acido ferulico acido cumarico
Trasformazioni enologiche Vinacce	0,9	30.000 catechine antocianine

Un efficiente processo di valorizzazione integrata degli scarti agro-industriali dovrebbe prevedere quindi anche uno stadio atto a recuperare selettivamente i biofenoli dalla matrice vegetale come *chemicals* ad alto valore aggiunto. Il recupero dei biofenoli è anche propedeutico ai successivi stadi fermentativi di trattamento della biomassa per la produzione di *biofuels*, infatti i processi di biotrasformazione microbica sono generalmente inibiti dalla presenza di polifenoli ed in particolare i batteri acetogenici e metanogenici sono sensibili a concentrazioni di acido caffeico >0,25 g/l e di acido *p*-cumarico >0.12 g/l. Queste caratteristiche anti-microbiche abbinate ad una nota fito-tossicità complica lo smaltimento di tali scarti che, quindi, costituiscono un costo per le diverse realtà produttive.

Un *waste management* sostenibile deve quindi necessariamente progredire di pari passo ad una adeguata valorizzazione commerciale dello stesso rifiuto trasformandolo in risorsa.

1.2. La parete cellulare vegetale

Funzioni e costituenti polisaccaridici

Le cellule vegetali sono cellule eucariote che si differenziano da quelle animali, anch'esse eucariote, per la presenza di una parete cellulare.

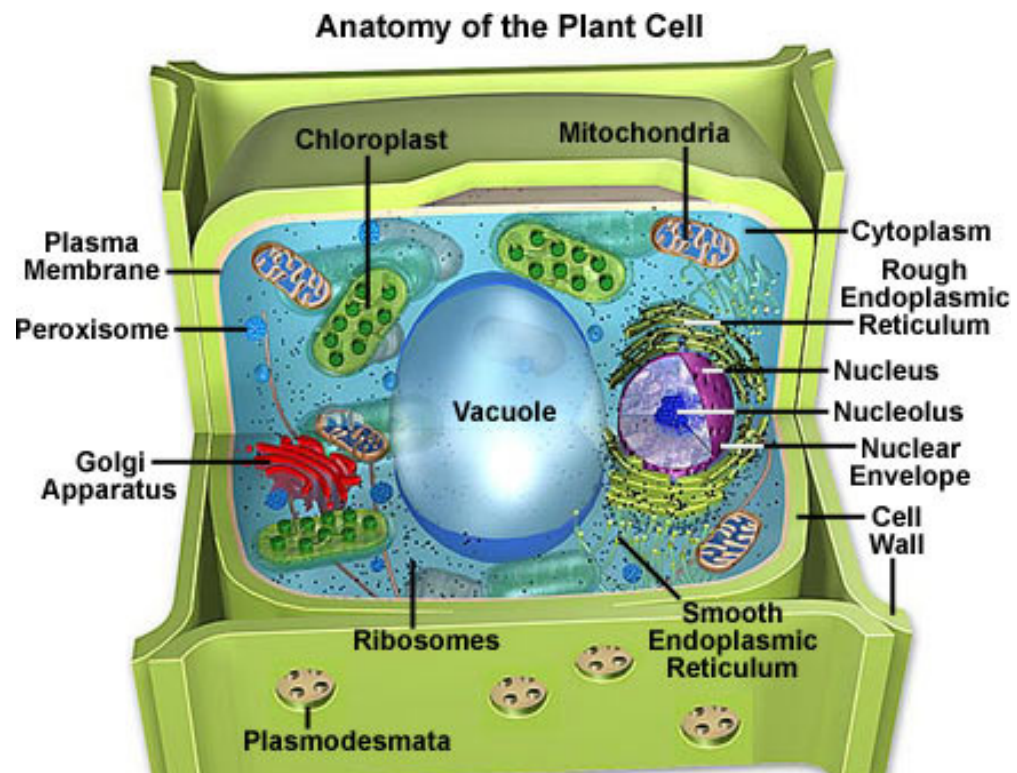


Figura 1.5: Rappresentazione di una cellula vegetale vista in sezione¹⁰.

La parete cellulare costituisce l'involucro esterno della cellula (figura 1.5.), si sviluppa attorno alla plasma membrana ed adempie a numerose funzioni, prima tra tutte quella di fungere da barriera fisica tra il contenuto della cellula e l'ambiente circostante.

1. Introduzione

Le funzioni principali della parete cellulare sono:

- conferire alla cellula una determinata forma;
- supporto strutturale e meccanico;
- regolazione della diffusione di materiale attraverso la cellula;
- protezione contro gli agenti patogeni mediante il rilascio di metaboliti che ne inibiscono la crescita, e in generale contro l'ambiente circostante;
- controbilanciare la pressione interna della cellula;
- permettere interazioni tra cellula e cellula.

La parete cellulare ha una struttura molto complessa che cambia man mano che la cellula cresce, nelle cellule giovani è più elastica e sottile mentre in quelle più adulte risulta più robusta.

La parete cellulare delle cellule vegetali è costituita principalmente da polisaccaridi e in misura minore da glicoproteine, esteri fenolici (acido ferulico e cumarico), minerali ed enzimi. I principali polisaccaridi che costituiscono la parete cellulare sono:

- cellulosa;
- emicellulosa;
- pectina.

La cellulosa è un polimero lineare costituito da unità di D-glucosio legate tra loro da legami β -1,4 glicosidici; questo polisaccaride è usato in natura principalmente come materiale strutturale per conferire forza e rigidità alle piante.

L'emicellulosa è un gruppo di polisaccaridi ramificati di varia struttura, ma omologhi alla cellulosa in quanto possiedono una catena principale i cui monomeri presenti in quantità maggiori sono alcuni zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati in modo analogo al glucosio nella cellulosa, ovvero mediante legami β -1,4. L'emicellulosa predominante in molte pareti cellulari è lo xiloglucano; altre emicellulose sono il glucuronoxilano, l'arabinoxilano, il glucomannano e il galattomannano.

1. Introduzione

La composizione chimica delle emicellulose varia con la crescita e la maturazione della pianta e dipende dalle condizioni ambientali.

La pectina è una famiglia di complessi polisaccaridi ad elevato peso molecolare (tra i 20 e i 400 KDa) e di natura acida, che contribuiscono largamente alla formazione dei tessuti specialmente dei frutti e delle parti vegetali eduli.

Da un punto di vista chimico, l'unità monometrica del polisaccaride è costituita dall'acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α -1,4; questa catena è intervallata da residui di 1,2-L-ramnosio. Nella struttura sono presenti anche altri carboidrati come D-galattosio, L-arabinosio, D-xilosio e L-fucosio che formano ramificazioni nella molecola.

Fino ad oggi sono state caratterizzate tre classi di polisaccaridi pectici:

- omogalatturonano (HG);
- ramnogalatturonano (RGI);
- galatturonani sostituiti (SG).

L'omogalatturonano (figura 1.6) è una catena lineare la cui unità monometrica è acido D-galatturonico che polimerizza mediante legami α -1,4, nella quale alcuni gruppi carbossilici sono esterificati con metanolo. L'omogalatturonano costituisce il 60% dei polisaccaridi peptici nella parete cellulare. Molti organismi patogeni possiedono enzimi (endo ed eso galatturonasi e liasi) in grado di frammentare le catene di omogalatturonano.

1. Introduzione

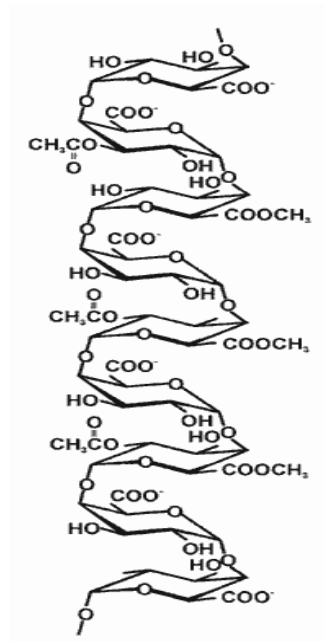


Figura 1.6: Struttura dell'omogalatturonano.

Il ramnogalatturonano (rappresentato in figura 1.7) è un polisaccaride la cui unità monometrica è il disaccaride 4- α -D-Galp-(1,2)- α -L-Rhap1, dove “Gal” sta per acido D-galatturonico e “Rha” per L-ramnosio. Sono poi presenti vari gruppi laterali, principalmente arabinani e galattani.

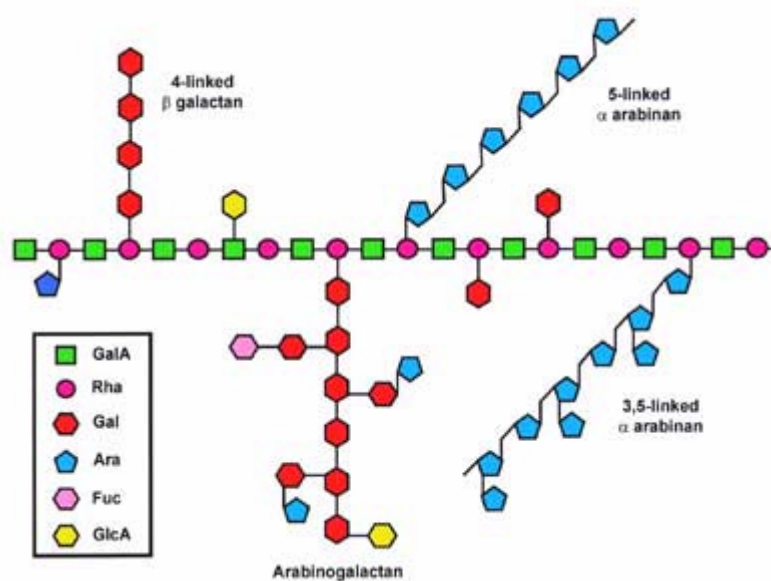


Figura 1.7: La rappresentazione del ramnogalatturonano (RGI)

1. Introduzione

Le sostanze pectiche ed emicellulosiche sono prodotte nell'apparato di Golgi ed in seguito inglobate in vescicole attraverso le quali migrano attraverso la plasma membrana dove sono rilasciate e integrate in una membrana pre-esistente; la cellulosa viene invece sintetizzata direttamente nella plasma membrana.

La composizione della parete cellulare vegetale e la sua struttura varia nel corso della vita della cellula e varia significativamente anche da cellula a cellula nonché all'interno di una stessa specie vegetale. Inoltre, nonostante si conoscano i costituenti delle pareti cellulari e si possa dire in che percentuali questi sono presenti, c'è ancora un vivace dibattito tra gli studiosi del ramo riguardo a come questi composti siano interconnessi tra loro, quindi non si conosce ancora nel dettaglio e con certezza la precisa configurazione di queste complesse strutture vegetali.

Costituenti non polisaccaridici: glicoproteine e lignina

Le glicoproteine non enzimatiche della parete cellulare vegetale sono un componente minoritario di queste strutture vegetali e generalmente non eccedono il 10% del peso secco della parete cellulare primaria. Questa componente per lungo tempo è stata considerata poco più che una struttura addizionale e di rinforzo della parete cellulare vegetale. Le interconnessioni tra proteine e polisaccaridi infatti rinforzano le interazioni tra i polimeri che costituiscono parete cellulare. Sono inoltre presenti interazioni tra proteine di parete e strutture ligniniche in alcune piante. Esistono legami tra le catene laterali fenoliche dei residui di tirosina nelle proteine ricche in glicina che sembrano essere coinvolti anche nella deposizione della lignina e i gruppi tirosina migliorano il cross-linking delle proteine nella lignina.

Recentemente il ruolo meramente strutturale delle glicoproteine non enzimatiche di membrana è stato ampiamente rivalutato. Tali strutture sembrano essere infatti coinvolte in diversi importantissimi processi del metabolismo e della

1. Introduzione

crescita della cellula vegetale. Alcune proteine come l'estensina sono coinvolte nei meccanismi assemblaggio e di crescita della parete cellulare, altre proteine ricche in prolina, sono coinvolte nei meccanismi di difesa innescati dalle aggressioni dei patogeni. Queste ed altre complesse funzioni, la maggior parte delle quali ancora da chiarire, ricoperte dalle proteine della parete cellulare dimostrano che il loro ruolo non è esclusivamente quello meramente strutturale ma anche quello di interconnettere le diverse strutture cellulari creando un continuum tra plasma-membrana e parete cellulare, funzione essenziale per il recepimento dei segnali che alla cellula arrivano dall'ambiente esterno¹¹.

La lignina è un polimero fenolico estremamente resistente presente in piante legnose e non, associato strettamente alla parete cellulare. La lignina è il secondo più abbondante composto organico naturale dopo la cellulosa. È sintetizzata dai vegetali a partire da monomeri di alcoli fenolici (*para*-cumaroil, coniferil e sinapil alcoli) tramite deidrogenazione mediata da perossidasi. Le principali funzioni della lignina sono quelle di conferire resistenza meccanica e chimica a protezione della pianta dalle aggressioni dei patogeni, e di mantenimento del giusto grado di idratazione viste le proprietà di impermeabilizzante.

Monocotiledoni e dicotiledoni

I vegetali possono essere suddivise in due grandi famiglie, che si differenziano tra l'altro per quella che è la composizione della parete cellulare: le monocotiledoni e le dicotiledoni.

Una tipica cellula di monocotiledone (figura 1.8.) possiede una parete cellulare costituita al 25% da cellulosa, al 55% da emicellulosa e da solo un 10% di pectina.

1. Introduzione

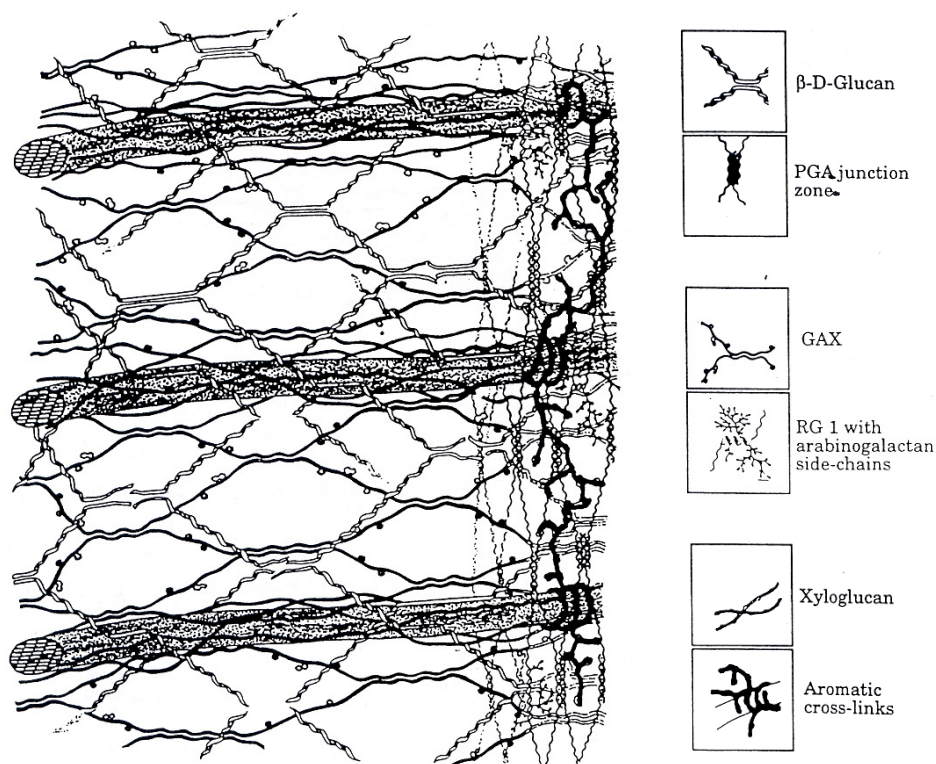


Figura 1.8.: La rappresentazione schematica di una parete cellulare di monocotiledone¹²

Alcune tra le piante più importanti da un punto di vista economico, nel gruppo delle monocotiledoni sono grano, frumento, mais, riso, bamboo, cipolla e aglio.

Prendendo in considerazione la famiglia dei cereali, la frazione polisaccaridica principale delle loro pareti cellulari è costituita da arabinoxilani. Gli arabinoxilani consistono in una catena polisaccaridica principale la cui unità monomerica è xilano (legami β -1,4), alla catena principale sono legati lateralmente residui di α -L-arabinofuranosio via legami α -(1,3) e/o α -(1,2).

Una tipica cellula di dicotiledone (figura 1.9.) invece possiede una parete cellulare costituita al 30% da cellulosa, al 30% da emicellulosa, al 35% di pectina e da un 1-5% di proteine strutturali.

1. Introduzione

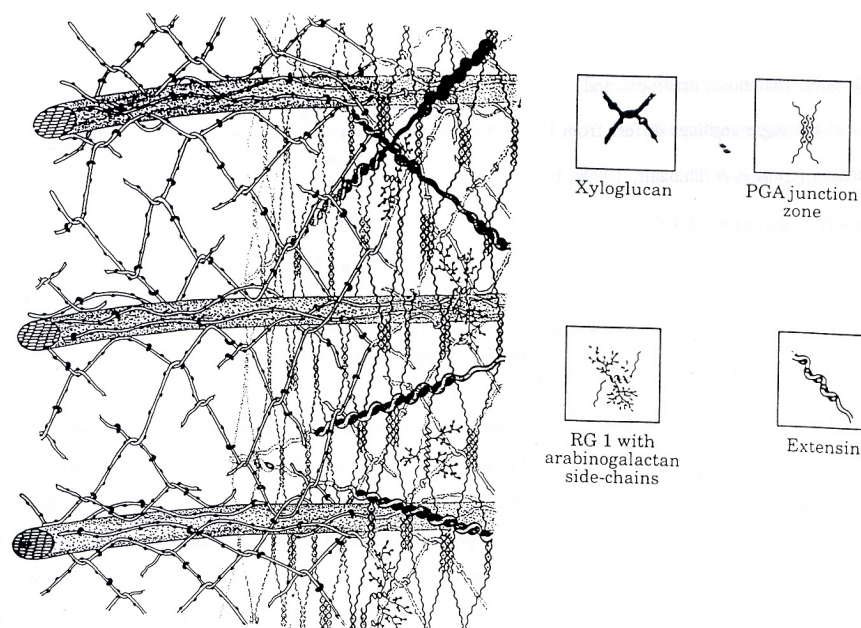


Figura 1.9.: La rappresentazione schematica di una parete cellulare di dicotiledone

Fanno parte di questa famiglia numerose piante tra le quali il pesco, l'albicocco, il ciliegio, il pero, il melo e il pomodoro.

Si conosce ancora poco per quel che riguarda l'organizzazione e l'interazione fra i vari costituenti le pareti cellulari vegetali. A questo proposito sono stati proposti vari modelli in cui si ipotizzano gli assemblaggi e le interazioni tra le diverse strutture macromolecolari delle pareti cellulari. Un modello, in cui si ipotizza l'organizzazione dei polisaccaridi nella parete cellulare di una pianta dicotiledone è stato proposto da Jean-Paul Vincken *et al.*¹³ 2004 è rappresentato in figura 1.10. Gli autori ritengono che le catene di cellulosa siano legate tra loro con legami a idrogeno e a formare un materiale cristallino insolubile e anelastico. Le fibre di cellulosa dovrebbero poi essere interconnesse a macromolecole emicellulosiche con legami a idrogeno a loro volta sono incluse in una matrice complessa costituita da pectina.

1. Introduzione

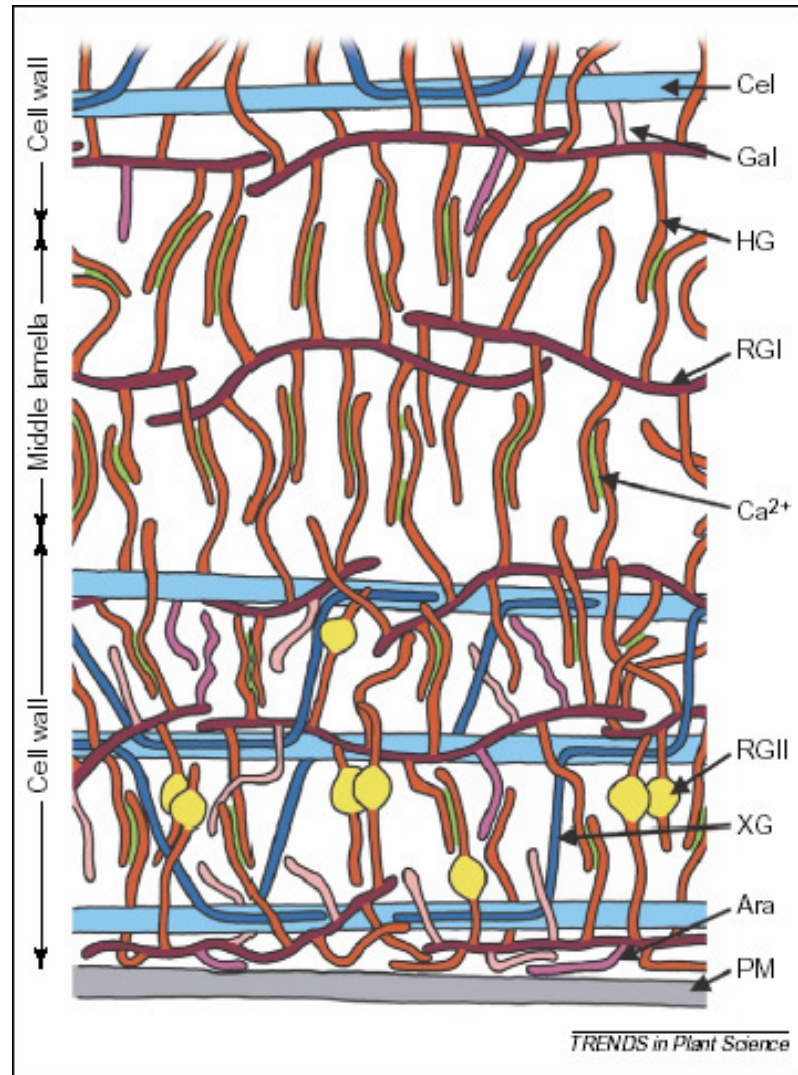


Figura 1.10: Rappresentazione del modello di organizzazione dei polisaccaridi all'interno di una parete cellulare di una cellula dicotiledone, proposto da Jean-Paul Vincken. (PM=plasma membrana; Ara=Arabinani; XG=xiloglucano; RGII=ramnogalatturonano II; RGI=ramnogalatturonano I; HG=omogalatturonano; Gal=galattani; Cel=cellulosa)

1.3 Biocatalizzatori industriali per l'idrolisi dei tessuti vegetali

I biocatalizzatori enzimatici sono sempre più largamente impiegati in molti settori dell'industria chimico-farmaceutica e della e trasformazioni agroalimentari a causa della loro intrinseca regio e stereo-selettività, nonché per il loro potenziale come efficienti catalizzatori alternativi per la chimica verde. I principali vantaggi tecnologici dell'impiego dei biocatalizzatori consiste nella possibilità di effettuare processi ad elevata efficienza in ambiente acquoso e in condizioni operative (pH, temperatura, pressione etc.) generalmente blande.

Il settore delle trasformazioni alimentari, da svariati anni ormai, fa largo uso di preparati enzimatici come additivi tecnologici in moltissimi processi. Dall'utilizzo di lipasi, libere o immobilizzate, nelle trasformazioni degli acidi grassi¹⁴, all'impiego di proteasi per la trasformazione delle carni¹⁵ sino all'impiego dell'amplessima classe delle carboidrasi, sfruttate in moltissimi settori, dalla produzione di succhi e puree a quella dei prodotti da forno, la stragrande maggioranza dei prodotti enzimatici commerciali è derivata da fermentazioni di funghi, lieviti e batteri. Molti microrganismi utilizzano infatti questi biocatalizzatori come strumenti per "aggredire" tessuti vegetali o animali al fine di procurarsi i substrati di crescita di cui necessitano per il proprio sostentamento.

In questa prospettiva la continua sfida tra microrganismi e piante, tra sistemi di aggressione e di difesa, ha fatto sì che un amplessima gamma di enzimi sia stata selezionata dall'evoluzione ed oggi possa venire impiegata dall'uomo in specifici processi tecnologici. Le pareti delle cellule vegetali sono infatti la prima difesa incontrata dagli agenti patogeni durante l'aggressione della pianta. Queste strutture devono essere degradate per consentire la penetrazione e la colonizzazione da parte dei patogeni a spese dei nutrienti contenuti nella pianta stessa. Le varie strutture polimeriche che costituiscono il tessuto vegetale sono i principali substrati per numerosi enzimi secreti dai microrganismi patogeni, fornendo esse stesse importanti elementi nutritivi ai patogeni.

***Cellulasi*¹⁶**

Le cellulasi (EC:3.2.1.4.) sono una classe di enzimi in grado di idrolizzare il legame β 1-4 glucosidico delle fibre di cellulosa. Industrialmente sono ampiamente utilizzate nelle industrie tessili e della produzione della pasta di cellulosa in cartiere. Industrialmente sono ottenute prettamente da funghi e muffe delle specie *Pleorotus*, *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Le cellulasi si dividono in tre classi principali:

- Endocellulasi (12-50 KDa), in grado aggredire la struttura della cellulosa in posizioni “centrali” della catena polisaccaridica, abbassando sensibilmente il peso molecolare medio delle catene;
- Esocellulasi (42-60 KDa), enzimi che attaccano le catene polisaccaridiche in posizione terminale liberando sequenzialmente oligomeri di glucosio a basso peso molecolare (cellobiosio);
- Cellobiasi o β -glucosidasi (35-218 KDa), in grado di idrolizzare il cellobiosio nei suoi monomeri di glucosio.

L'azione delle β -glucosidasi è estremamente importante ai fini industriali in quanto le cellulasi, come tutte le carboidrati, soffrono di inibizione competitiva da prodotto, soprattutto a causa di oligomeri a basso peso molecolare. La presenza di β -glucosidasi che rimuovono il cellobiosio idrolizzandolo, consente di migliorare le preformance idrolitiche dei trattamenti a base di cellulasi.

***Emicellulasi*¹⁷**

Sono genericamente definite emicellulasi quella grande categoria di enzimi in grado di idrolizzare i legami glucosidici delle diverse strutture polisaccaridiche che compongono le emicellulose. Data la grande complessità e diversità delle emicellulose presenti in natura è ovvio che la stessa complessità e differenziazione si ritrovi anche nei biocatalizzatori naturalmente selezionati per l'idrolisi di tali strutture che sono genericamente classificati come EC 3.2.1.X..

1. Introduzione

Le emicellulasi sono enzimi in grado di idrolizzare polisaccaridi ramificati di varia struttura, costituiti una catena principale di zuccheri esosi (glucosio, mannosio e galattosio) e pentosi (arabinosio e xilosio) policondensati mediante legami β -1,4. Le emicellulosa così come le emicellulasi sono usualmente classificate in base alle tipologie di zuccheri che le compongono principalmente. In natura, tra le più diffuse nelle pareti cellulari vegetali, troviamo gli xilani, i mannani, gli arabani e i galattani rispettivamente idrolizzati da xilanasi (EC:3.2.1.8.), mannanasi (EC:3.2.1.78), arabinasi (EC:3.2.1.99.) e galatturonasi (EC:3.2.1.15.).

Anche questi enzimi sono generalmente prodotti da funghi e muffe (*Trichoderma sp.*) e sono estremamente importanti in diverse applicazioni industriali come coadiuvanti delle cellulasi nelle applicazioni precedentemente descritte o in altri importanti processi come la produzione di birra.

***Pectinasi*¹⁸**

Le pectinasi sono una vasta famiglia di enzimi in grado di aggredire le diverse e complicatissime strutture poligalatturoniche dei vegetali. Questi biocatalizzatori sono tra i più diffusi per applicazioni industriali soprattutto nei settori di produzione di succhi e alimenti in generale. Si stima che questi preparati costituiscano il 25% del mercato globale degli enzimi e la più comune fonte dal quale vengono estratti è *Aspergillus niger*¹⁹.

Le pectinasi sono classificate in base al tipo di legame che idrolizzano nella struttura pectica (figura 1.11.):

- Le polimetilgalatturonasi e le poligalatturonasi (EC 3.2.1.15) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico più o meno mutilato;
- Le pectinesterasi (EC 3.1.1.11) rimuovono il gruppo metile delle pectine idrolizzando il legame estere, ove presente, del carbossile del galatturone;

1. Introduzione

- Le pectin liasi (EC 4.2.2.10) idrolizzano i legami α -1,4 tra le unità di acido galatturonico tramite un meccanismo di trans eliminazione inusuale per le carboidrasi che produce dei galatturonati o metilgalatturonati insaturi.

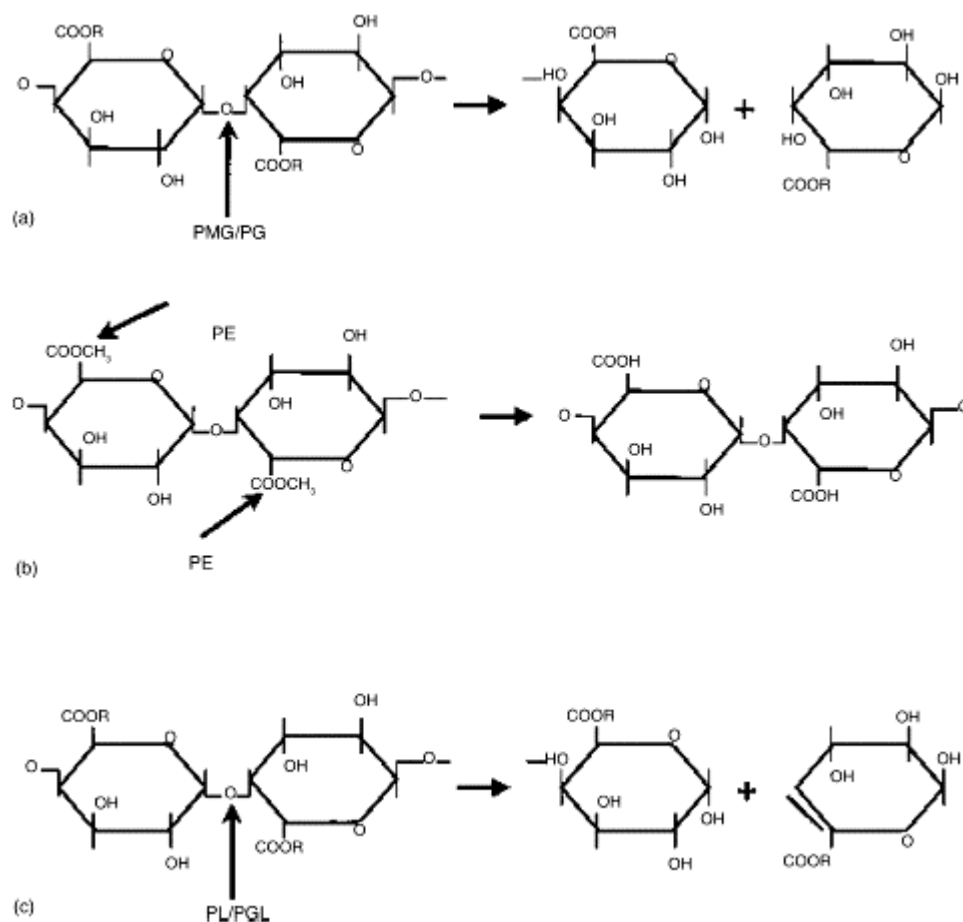


Figura 1.11: modo d'azione delle pectinasi: (a) R = H per PG e CH₃ per PMG; (b) PE; e (c) R=H per PGL e CH₃ per PL. La freccia indica il legame idrolizzato dalla pectinasi. PMG, polimetilgalatturonasi; PG, poligalatturonasi (EC 3.2.1.15); PE, pectinesterasi (EC 3.1.1.11); PL, pectin liasi (EC-4.2.2.10) (Da Jayani *et al.* 2005).

*Aril esterasi*²⁰

Le aril esterasi sono enzimi in grado di idrolizzare i legami estere tra la funzionalità carbossilica di un fenolo acido e una funzionalità idrossile di un carboidrato facente parte delle strutture polisaccaridiche della parete cellulare vegetale. I fenoli esterificati principalmente presenti nelle pareti cellulari vegetali sono l'acido cumarico, l'acido cinnamico e l'acido ferulico. Quest'ultimo è

1. Introduzione

soprattutto presente anche grazie alla sua capacità di formare diverse tipologie di dimeri che consentono di creare strutture a ponte tra due catene polisaccaridiche conferendo alla struttura una maggiore stabilità e resistenza meccanica. In piante dicotiledoni come gli spinaci e la barbabietola da zucchero, l'acido ferulico è generalmente legato al gruppo idrossile C-6 dei β -1,4-galattani e al gruppo idrossile C-2 degli α -1,5-L arabinani. In piante monocotiledone ed erbe, come bambù, canna da zucchero, grano e granturco l'acido ferulic esterifica i gruppi idrossile C-4 dello xilosio degli xiloglucani e i gruppi idrossile C-5 dell'arabinosio degli arabinoxilani.

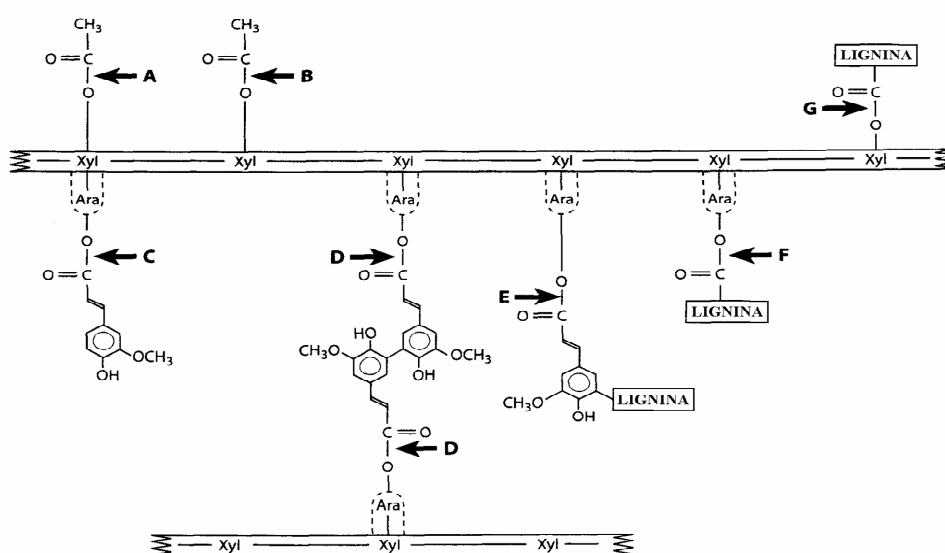


Figura 1.12.: Struttura generale e semplificata dell'arabinoxilano. Dalle catene xilaniche partono delle ramificazioni di arabinosio. I legami esterei substrato delle aril esterasi sono: A) gruppo 2-O-acetilico; B) gruppo 3-O-acetilico; C) gruppo 5-O-ferulico; D) gruppi 5-O-diferulici (dimero con legami 5-5'); E) 5-O-feruloil-lignina; F) arabinosio-lignina; G) xilosio-lignina²¹.

Le feruloil esterasi (EC 3.1.1.73) sono state recentemente suddivise in famiglie, A-D, in base alle proprie affinità per diverse tipologie di substrati (tabella 1.3.)²².

1. Introduzione

Tabella 1.3.: Classificazione delle feruloil esterasi basata sulla capacità di idrolizzare metil esteri di diversi fenoli acidi (MFA: metil ferulato, MSA: Metil senapato, MpCA: metil para cumarato, MCA: metil caffeato), rilasciare dimeri ferulici 5-5' da substrati modello e complessi e in base alle identità della sequenza amminoacidica primaria con altri enzimi.

	Tipo A	Tipo B	Tipo C	Tipo D
Capacità di idrolisi dei metil esteri	MFA, MSA, MpCA	MFA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA	MFA, MSA, MpCA, MCA
Rilascio di diferulati	5-5'	No	No	5-5'
Similarità sequenziale	Lipasi	Acetil xilan esterasi (Carboidrato esterasi famiglia I)	Clorogenato esterasi tannasi	Xilanasi

Il rilascio enzimatico dell'acido ferulico esterificato di posizione C-2 o C-5 delle catene laterali α -L-arabinofuranosiche degli arabinoxilani e dei dimeri ferulici che formano i ponti inter- e intra- catena coinvolti nel cross-linking di polimeri all'interno della parete cellulare può essere ottenuto utilizzando una batteria di enzimi che comprenda diverse esterasi (acetil xylan esterasi, feruloyl esterasi, cinnamoyl esterasi), insieme con le principali carboidrati come le endo-1, 4 xylanasi, L-arabinofuranosidasi e xylosidasi.

Proteasi²³

Le proteine della parete cellulare dei vegetali sono degradate da proteasi, enzimi che scindono il legame peptidico tra due amminoacidi in una proteina. Le proteasi possono agire sia in maniera endo- che eso- e a volte possono idrolizzare anche altri tipo di legami rispetto a quello peptidico.

Le proteasi²⁴ sono classificate in quattro gruppi principali a seconda del loro meccanismo di azione:

1. Introduzione

- serin-proteasi (chimotripsina, tripsina, elastasi etc.) tutte inibite dal diisopropilfosforofluoridato, contengono dei residui di serina e istidina coinvolti nel meccanismo di idrolisi al sito catalitico;
- sulfidril-protesi (papaina, bromelaina, etc.) inibite da reagenti sulfidrilici, contenenti residui cisteinici e istidinici al sito catalitico;
- metallo proteasi (carbossipeptidasi A e B) esopeptidasi che richiedono un cofattore metallico;
- Aspartic-proteasi (pepsina, chimosina, etc.) conosciute anche come proteasi acide per via del basso pH ottimale di lavoro, che contengono due residui di acido aspartico nel sito catalitico.

1.4. Struttura e trasformazione del grano duro

Il frumento è oggi uno cereali più importanti per l'alimentazione umana, le specie più diffuse (di cui si conoscono e si selezionano migliaia di varietà) sono il *Triticum durum*, o frumento duro, la cui destinazione d'uso principale è la produzione di pasta, ed il *Triticum aestivum*, o frumento tenero, impiegato per la produzione di pane e di altri prodotti da forno.

La cariosside dei cereali è un frutto il cui corpo fruttifero è tutt'uno con il seme, di piccole dimensioni variabili comunque a seconda della specie. La struttura anatomica della cariosside di tutti i cereali è sostanzialmente simile: si riconoscono infatti tre regioni principali, corrispondenti ai tegumenti (sia del frutto che del seme), all'embrione (comunemente definito germe) e all'endosperma amilaceo o mandorla farinosa (figura 1.13.). Ognuna di queste regioni è composta da più strati e possiede un'organizzazione strutturale ed una composizione chimica diversa e specifica per meglio rispondere alla propria funzione biologica (tabella 1.4). L'embrione, o germe, consiste in un abbozzo della futura pianta (asse embrionale) e in una regione (scutello) in grado di fornire principi nutritivi alla pianta durante la germinazione. La composizione dell'embrione è perciò caratterizzata da un'elevata presenza in proteine, lipidi, zuccheri solubili e vitamine. L'endosperma rappresenta percentualmente la maggior parte del chicco ed è la fonte di farina. E' composto da due regioni, la più esterna delle quali è conosciuta come strato aleuronico. Si tratta di un tessuto assai ricco in proteine, sali minerali, vitamine ed enzimi. La maggior parte dell'endosperma è rappresentato dalla cosiddetta mandorla, o albume, costituita da cellule in cui sono immagazzinati, in forma insolubile, importanti nutrienti che potranno essere resi disponibili durante la fase di germinazione del chicco. La frazione glucidica è per la maggior parte rappresentata dall'amido, sotto forma di granuli; il secondo costituente, in termini percentuali, sono le proteine. In tutti i cereali vi è un gradiente di concentrazione di questi due componenti, via via che si passa dalle cellule esterne della mandorla, più ricche in proteine, verso quelle più

1. Introduzione

centrali, più ricche in amido. I tegumenti sono composti da numerosi strati, alcuni afferenti al frutto (pericarpo), altri al seme (testa), la cui funzione protettiva è garantita dalla composizione particolarmente ricca in fibre cellulosiche ed emicellulosiche, sali minerali e fitati. La cariosside all'interno della spiga è protetta anche da altre strutture, le glume brattee. In alcuni cereali (quali orzo, riso, avena) questi rivestimenti sono intimamente associati ai tegumenti del frutto: per questa caratteristica tali cariossidi sono definite “vestite”, a differenza quelle degli altri cereali, denominate “nude” o “svestite”, in quanto si liberano facilmente di tali parti durante le operazioni di trebbiatura. L'eliminazione delle glume nelle cariossidi vestite è indispensabile se il cereale è destinato ad usi alimentari, causa dell'elevato contenuto in silice.

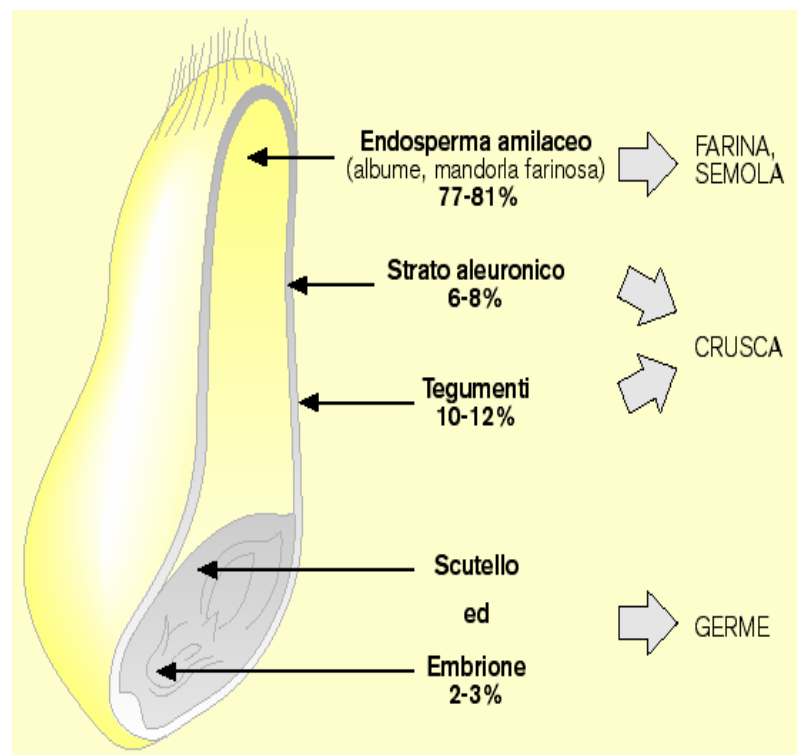


Figura 1.13: Struttura della cariosside di frumento e suddivisione percentuale nelle diverse zone anatomiche con indicazione dell'origine dei prodotti e sottoprodotti di macinazione.

1. Introduzione

Tabella 1.4: Composizione della cariosside di grano (chicco) e delle sue regioni anatomiche.

Regione anatomica del chicco	Percentuale della cariosside	Amido e altri carboidrati %	Proteine %	Lipidi %	Cellulose emicellulose Pentosani %	Minerali %
<i>Tegumento frutto (pericarpo)</i>	4	14-16	10-14	1-3	60-74	3-5
<i>Tegumento seme (testa)</i>	1	9-11	13-19	3-5	53-63	9-15
<i>Strato aleuronico</i>	8	10-14	29-35	7-9	35-41	5-15
<i>Germe</i>	3	19-21	36-40	13-17	20-24	4-6
<i>Endosperma</i>	82	80-85	8-14	2-3	1-3	0,5-1,5

Conoscere le proprietà funzionali e il valore nutrizionale dei diversi costituenti della cariosside è basilare per comprendere i fenomeni che hanno luogo durante la trasformazione dei cereali in alimenti. Il successo e la diffusione del frumento rispetto agli altri cereali sono, ad esempio, legati alla capacità delle sue proteine di strutturarsi in un particolare complesso, conosciuto come glutine, vera e propria “impalcatura” di tutti i prodotti derivati dal grano²⁵.

Carboidrati

La maggior parte dei carboidrati presenti nella cariosside dei cereali è rappresentata dall'amido, macromolecola con funzioni di riserva, localizzata esclusivamente nell'endosperma. La pianta, a partire dal glucosio, sintetizza due diversi polimeri, l'amilosio e l'amilopectina (figura 1.14.), accumulati nelle cellule sotto forma di granuli. Nel granulo d'amido di quasi tutti i cereali l'amilosio rappresenta solo il 20-25%.

1. Introduzione

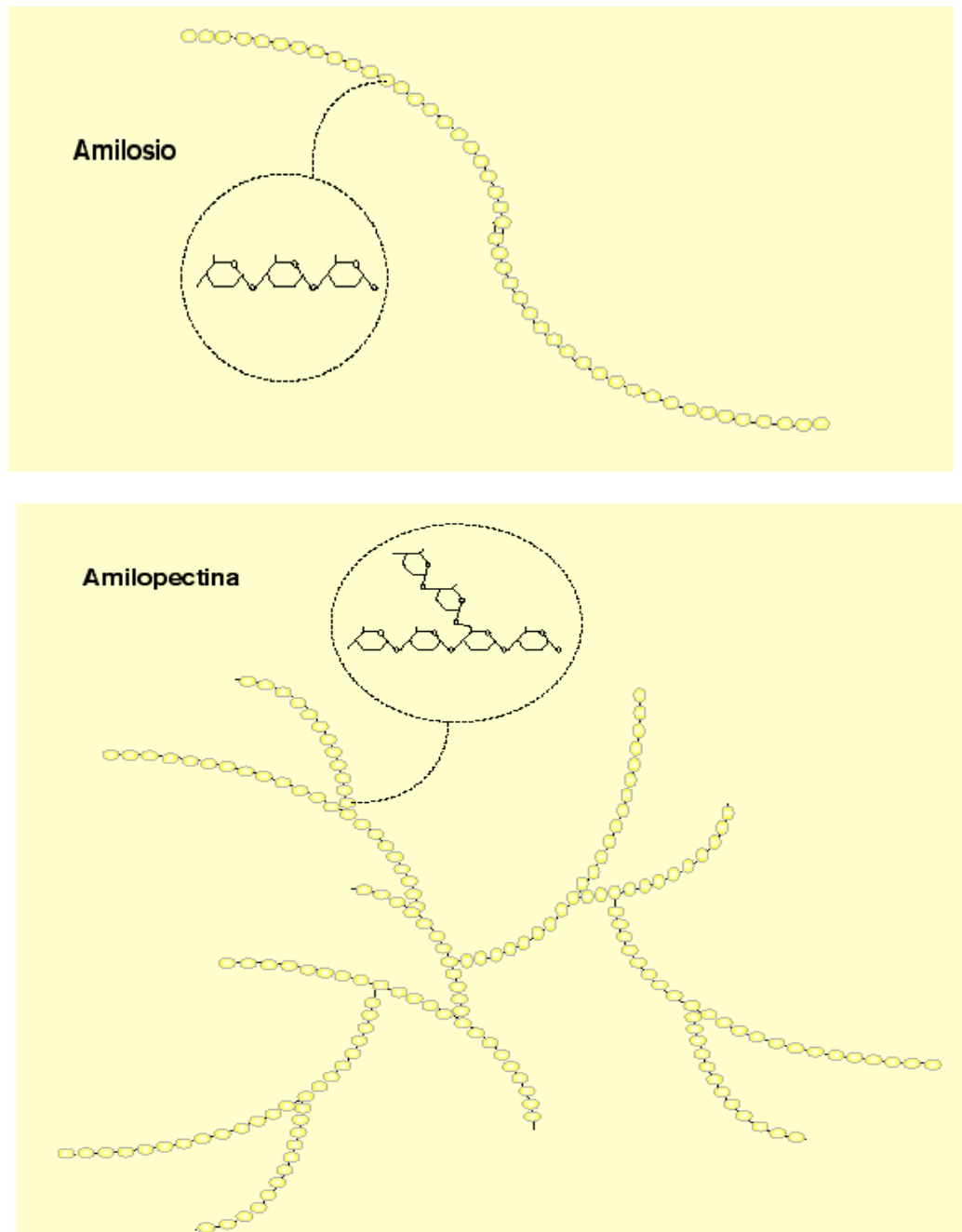


Figura 1.14.: Struttura semplificata di amilosio e amilopectina.

La disposizione di amilosio e amilopectina all'interno del granulo non è casuale infatti il granulo d'amido, in cui sono riconoscibili strati successivi di accrescimento, mostra proprietà semicristalline, proprie di strutture "ordinate".

Questo materiale è caratterizzato da una spiccata insolubilità in acqua a freddo, ma cambia totalmente il proprio comportamento se, in presenza d'acqua, è sottoposto ad un riscaldamento. A partire dai 50-60 °C, i granuli sono interessati a

1. Introduzione

fenomeni di gelificazione, in cui sono riconoscibili più fasi: dapprima si osserva il rigonfiamento dei granuli di amido con incremento della viscosità del sistema ad opera dell'acqua che diffonde verso l'interno e solubilizza le regioni cristalline di amilopectina, cui segue la rottura della struttura così rigonfiata con fuoriuscita e parziale solubilizzazione del materiale amilaceo nell'acqua, e formazione di quella che è comunemente definita salda d'amido. Ed è proprio questa proprietà funzionale che consente di utilizzare l'amido in numerose preparazioni industriali, come agente addensante o stabilizzante di gel ed emulsioni, o ancora come agente legante. La gelificazione, che può essere più o meno intensa e vistosa a seconda dell'origine botanica dell'amido e della quantità d'acqua presente nel sistema, produce interessanti modificazioni sulla digeribilità dell'amido: infatti le macromolecole di amido gelificato sono più facilmente idrolizzabili da parte dei sistemi enzimatici, quali l'alfa e la beta amilasi. Nella cariosside matura dei cereali si ritrovano solo in modeste quantità forme più semplici di carboidrati, quali glucosio, fruttosio, maltosio e saccarosio derivanti dalla degradazione dell'amido. La loro concentrazione aumenta durante la preparazione della pasta e i mono-di e trisaccaridi sono importanti per la lievitazione della pasta in presenza di lievito.

Carboidrati strutturali: cellulosa e pentosani

Nelle parti tegumentali del chicco, dove si ritrovano cellule con una grossa parete cellulare, i carboidrati sono rappresentati da molecole con funzione biologica strutturale. La cellulosa è un polimero costituito da solo glucosio, ma le singole unità sono interessate in un legame diverso da quello tipico dell'amido e, perciò, non idrolizzabile da parte dei sistemi amilolitici. Questa grossa macromolecola (anche in questo caso le unità di glucosio ammontano a diverse migliaia) si presenta completamente insolubile in acqua e assicura rigidità alla parete cellulare. Essa rappresenta una frazione importante di quella che viene comunemente chiamata fibra alimentare, di cui è stato largamente illustrato l'effetto positivo sulla peristalsi intestinale. Un altro interessante componente

1. Introduzione

delle pareti cellulari è rappresentato dalla frazione dei pentosani, polimeri assai complessi formati da zuccheri diversi dal glucosio (pentosi) che vanno a costituire parte della fibra non cellulosica presente nei sottoprodotti dell'industria del cereale (25-40% sul secco)²⁶.

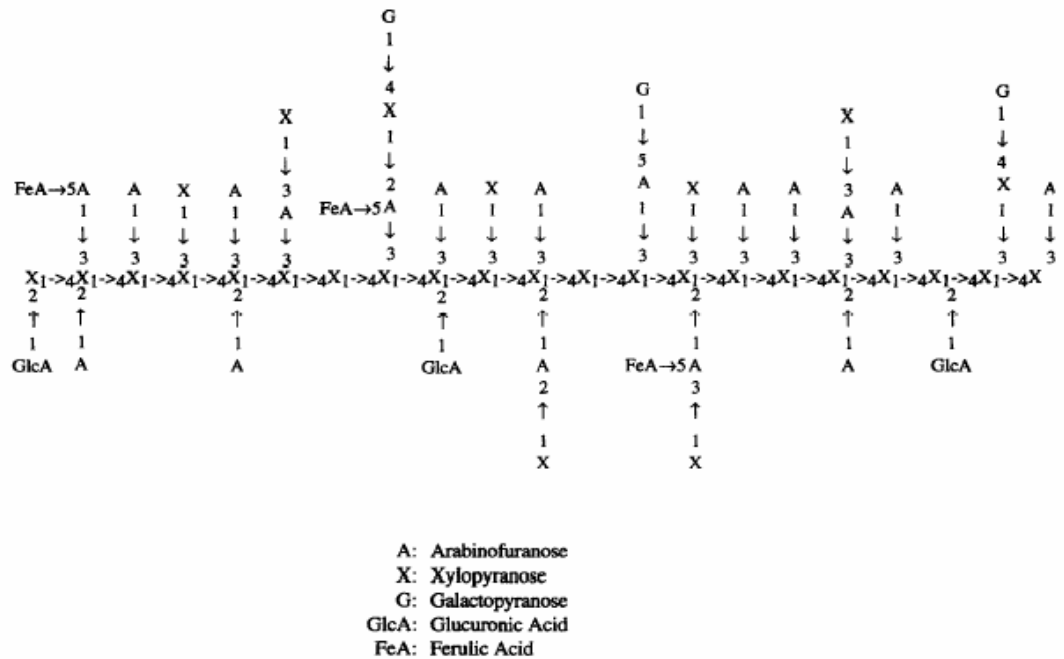


Figura 1.15.: Struttura schematica della frazione zuccherina di eteroxilani (pentosani) nella crusca di mais²⁷.

1. Introduzione

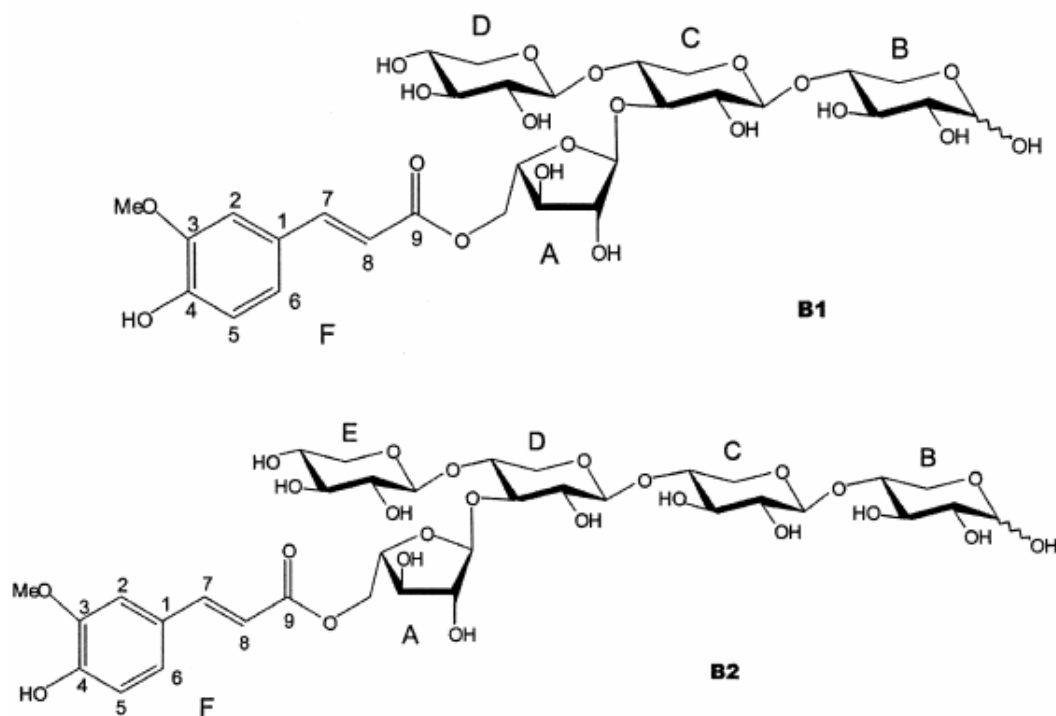


Figura 1.16.: Structure of compounds B1 and B2. B1: O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-O-[5-O-(feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose. B2: O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-O-[5-O-(feruloyl)-α-L-arabinofuranosyl-(1→3)]-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-O-β-D-xylopyranosyl-(1→4)-D-xylopyranose.

Principalmente i pentosani sono arabinoxilani (figura 1.15.). Sono costituiti da catene polimeriche di D-xilosio con legame β-(1→4) e sostituite al 50% gruppi laterali. I sostituenti più frequenti sono α-L-arabinosio, alle posizioni O-2 e O-3 dei residui di D-xilosio, acido D-glucuronico o il relativo 4-metiletere, alla posizione O-2, e i gruppi acetile in posizione O-2 o O-3 di alcuni D-xilosi. Inoltre importanti sono i sostituenti costituiti da α-L-arabinosio derivatizzati con acidi ferulici (figura 1.16.) e p-cumarici tramite legami estere (3→5). I gruppi ferulici possono dimerizzare formando legami a ponte fra le diverse catene polisaccaridiche oppure legarsi con la lignina attraverso legami etere-estere formando così una struttura protettiva per l'attacco enzimatico delle catene di xilano²⁸.

Una parte dei pentosani 1-1,5% in frumento è solubile in acqua e questa frazione, costituita principalmente da una catena lineare di arabinoxilani ad alto peso molecolare, può assorbire acqua 15-20 volte il proprio peso formando così una soluzione altamente viscosa. Le catene con arabinosio possono subire idrolisi acida liberando xilano poco solubile in acqua.

1. Introduzione

I pentosani insolubili si possono suddividere ulteriormente in solubilizzabili da trattamenti in alcali o enzimatici e in residui non solubilizzabili²⁹.

Il fatto che non si riesca ad estrarre tutti gli arabinoxilani dalle pareti delle cellule con acqua è probabilmente dovuto a una combinazione di interazioni non covalenti e di legami con molecole vicine componenti la stessa parete cellulare quali proteine, cellulosa e lignina. La componente di arabinoxilani solubilizzati da alcali inoltre sono più facilmente degradabili enzimaticamente che la frazione solubile di pentosani.

La parte insolubile dei pentosani rigonfia in acqua ed è quindi responsabile delle proprietà reologiche della pasta e del comportamento di cottura aumentando la succosità della briciola e dei prodotti da forno³⁰.

I pentosani in genere svolgono un ruolo importante nella qualità di cottura dell'impasto da frumento poichè partecipano alla formazione del glutine. I preparati di pentosani da segale, una volta purificati tramite elettrodialisi ed aggiunti alla farina di frumento (2%), migliorano la qualità di cottura della farina, in particolare il volume del pane e la struttura della briciola, ma fanno diminuire la freschezza.

In questi ultimi anni è stato loro riconosciuto un ruolo attivo nella formazione dell'impasto, dovuto all'elevata capacità di legare acqua.

Lipidi

Questi costituenti delle cariossidi sono generalmente considerati “minori” a causa della loro limitata quantità. Ciò nonostante, la loro importanza è rilevante sia da un punto di vista nutrizionale che tecnologico. I lipidi dei cereali costituiscono una classe estremamente eterogenea di sostanze, distribuita in maniera assai diversificata nei diversi tessuti del chicco. Accanto ai trigliceridi, i più rappresentati nel tessuto dell'endosperma, la cariosside contiene lipidi polari, le cui proprietà funzionali (emulsionanti, stabilizzanti) consentono interazioni con molecole proteiche ed amilacee e sono strategiche per le trasformazioni tecnologiche. Il germe e le cellule dell'aleurone sono ricchi in trigliceridi, presenti

1. Introduzione

come sferosomi, mentre i fosfolipidi ed i glicolipidi predominano nell'endosperma.

Proteine

Le proteine presenti nei cereali sono distribuite in percentuale diversa a seconda della regione del chicco. Sebbene interessanti per quantità (circa il 10% dell'intero chicco), si ritiene che la componente proteica dei cereali soddisfi solo in parte le esigenze nutrizionali dell'uomo in quanto carente di alcuni amminoacidi essenziali, in primo luogo la lisina (figura 1.17.).

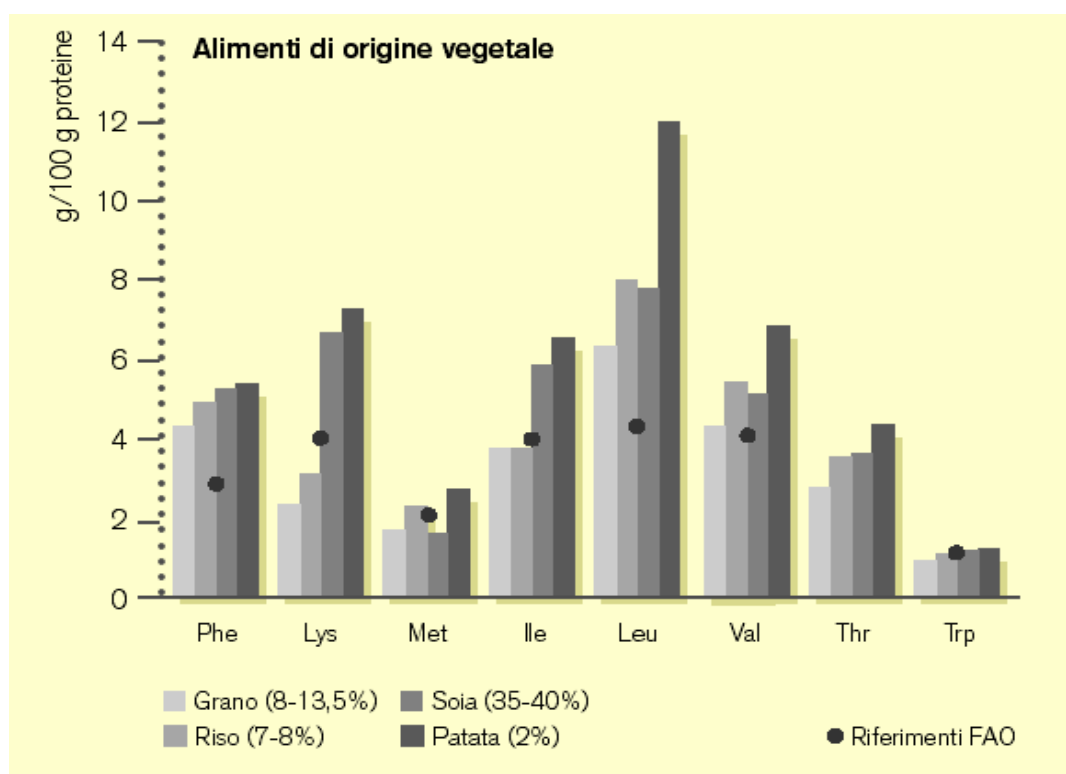




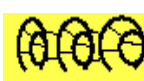
Figura 1.17.: Contenuto in amminoacidi essenziali delle proteine di alcuni alimenti di origine vegetale: confronto con proteina di riferimento FAO. In parentesi è indicato il contenuto di proteine in ciascun alimento.

La complessità e l'eterogeneità che caratterizza le proteine dei cereali è enorme. Tradizionalmente la maggior parte degli studi relativi a questo settore

1. Introduzione

prevede una suddivisione delle molecole proteiche dei cereali in 4 differenti classi a seconda della loro solubilità (tabella 1.4.).

Tabella 1.4.: Classificazione e principali caratteristiche delle proteine dei cereali.

Natura	Gruppi	Solubilità	M.W.	Struttura	Proprietà	% in peso
Proteine citoplasmatiche	Albumine	Acqua	Basso		Enzimatiche	15-20
	Globuline	Soluzione di sali	Basso		Schiumogene emulsionanti	
Proteine di Deposito: endosperma	Gliadine	Etanolo 70%	Basso		Estensibilità	40
	Glutenine	Acidi, basi agenti idrofobici	Alto >100.000		Elasticità tenacità	40

Si parla perciò di proteine solubili (albumine e globuline), per lo più proteine con funzioni enzimatiche, e di proteine insolubili o proteine di riserva, a loro volta distinte in prolamine e gluteline (rispettivamente gliadine e glutenine nel frumento).

La prima frazione, quella solubile, è particolarmente rappresentata nell'embrione e nello strato aleuronico. Le seconde, che raggruppano percentualmente anche l'80% della componente proteica, sono localizzate nell'endosperma. La loro funzione biologica è completamente diversa da quella che contraddistingue le proteine solubili: si tratta in questo caso di sostanza di riserva, organizzate in una matrice tra i granuli d'amido.

Il rapporto prolamine/gluteline è diverso a seconda dei cereali. Nel caso del frumento queste due classi sono presenti in quantità confrontabile e sono caratterizzate da una composizione amminoacidica assai particolare, caratterizzata da una elevata percentuale (un terzo circa di tutti i residui amminoacidici) di acido glutammico (come glutamina) e di prolina, e di una bassa quantità di lisina. Questa particolare composizione consente a queste proteine di riserva di strutturarsi, durante l'impastamento della farina con acqua, in un complesso unico nel mondo vegetale, conosciuto come glutine e che può essere inteso come un tessuto reticolare. Le proprietà plastiche ed elastiche del glutine (proprietà reologiche) sono determinanti per la trasformazione della farina in pane o in qualsiasi altro prodotto da forno, e della semola in pasta alimentare.

1. Introduzione

Le diverse migliaia di varietà di frumento sono state selezionate nel corso degli anni in modo da migliorare anche il comportamento tecnologico del relativo sfarinato e, dunque, la sua idoneità alla trasformazione in un ben definito prodotto. I trattamenti termici, sempre presenti nel processo produttivo dei prodotti derivati dei cereali (es. cottura in forno, essiccazione della pasta e sua cottura, ecc.) modificano in maniera sostanziale anche le proprietà funzionali delle proteine. A partire dai 60-70 °C le proteine, indipendentemente dall'umidità del sistema, sono interessate da fenomeni di denaturazione e coagulazione. Nel caso del glutine il trattamento termico stabilizza la struttura reticolare che perde così la sua capacità nativa di estendersi e di deformarsi, ma anche di resistere a sollecitazioni troppo intense. Le proteine solubili sono per lo più proteine con attività enzimatiche. Gli enzimi maggiormente presenti sono di tipo idrolitico (amilasi, proteasi, lipasi), ma le cariossidi possiedono anche attività di tipo ossidativo (lipossigenasi, perossidasi). In molti processi tecnologici di trasformazione dei cereali le attività enzimatiche devono essere attentamente controllate.

Minerali e vitamine

La maggior parte delle sostanze minerali contenute nella cariosside dei cereali è localizzata nelle parti tegumentali ed è costituita da fosfati e solfati di potassio.

Il fosforo è presente inoltre nei fitati (sali dell'acido mio-inositolo esaforico) considerati la forma principale di riserva di fosforo nei semi delle piante. Essi sono utilizzati in molte funzioni fisiologiche importanti durante il periodo di dormienza e germinazione dei semi. Le proprietà nutrizionali negative di questi sali sono ben note e sono dovute alla loro capacità di formazione di complessi con i minerali, riducendo la biodisponibilità di questi ultimi. I cereali contengono in tracce numerosi elementi, tra cui ferro, rame e zinco.

I cereali rappresentano una importantissima fonte di vitamine, soprattutto del gruppo B. Esse sono localizzate prevalentemente nei tessuti del germe ed in quelli più periferici dell'endosperma. La separazione di queste parti, operazione

1. Introduzione

conseguente i trattamenti di macinazione del grano e di brillatura del riso, produce una forte perdita di questi principi nutritivi.

La molitura

La molitura è il processo tecnologico che consente la trasformazione delle cariossidi dei cereali in sfarinati. Viene anche definito processo di macinazione a secco in quanto i chicchi vengono lavorati in assenza di acqua.

Di seguito sono riportate alcune definizioni sui prodotti da molitura.

Farina

È denominata “farina di grano tenero” o semplicemente “farina” il prodotto ottenuto dalla macinazione e conseguente abburattamento del grano tenero liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità. Le farine di grano tenero possono essere prodotte solo nei tipi “00”, “0”, “1”, “2” e “integrale”.

Semola

È denominata “semola di grano duro” o semplicemente “semola” il prodotto granulare a spigolo vivo ottenuto dalla macinazione e conseguente abburattamento del grano duro, liberato dalle sostanze estranee e dalle impurità.

Il processo di scomposizione serve ad ottenere da una parte farina e dall'altra delle frazioni ad alto valore aggiunto nutrizionale da ricomporre con la farina stessa in proporzioni specifiche. Lo scopo della molitura è quello di ottenere delle farine nelle quali prevalgono i costituenti principali dell'endosperma che sono all'80% amidi³¹.

La qualità di uno sfarinato è valutata non solo in termini di composizione chimica, ma principalmente sulla base delle caratteristiche reologiche degli impasti, preparati ed analizzati secondo metodiche standardizzate.

La composizione chimica delle farine dipende quindi dalla percentuale di materiale estratto dal chicco che si ottiene durante la molitura. In tabella 1.5. vengono riportate le composizioni di diverse tipologie di farina ottenuta a diverse percentuali di materiale estratto.

1. Introduzione

Tabella 1.5.: Composizione delle diverse tipologie di farine

Tipo di farina	Percentuale di estrazione	Composizione
405	40-56%	Amido 84,2% Proteine 11,7% Fibra 3,7%
812	76-79%	Amido 78,4% Proteine 13,0% Fibra 4,1%
1700	100%	Amido 66,0% Proteine 14,8% Fibra 10,9%

Si osserva che aumentando la quantità di percentuale di estrazione decresce proporzionalmente la percentuale di amido mentre aumenta quella delle frazioni derivanti dalla crusca.

La farina di tipo 1700 è ricca di tutti i componenti del chicco compresa la frazione fibrosa indigesta che può costituire un problema durante le lavorazioni industriali. Un'estrazione di circa 80% permette di ottenere un buon contenuto di amido e una bassa concentrazione di fibra. In compenso il 20% che non è stato estratto e quindi trasformato in farina, va a costituire la così detta crusca.

La separazione del germe e degli strati più esterni della cariosside durante il processo di molitura inevitabilmente determina profonde modificazioni nella composizione chimica e, di conseguenza, nel valore nutrizionale dei prodotti finiti. In particolare, la farina o la semola presentano rispetto alla cariosside una minore concentrazione di ceneri, di proteine, di vitamine e di zuccheri semplici e un maggiore contenuto di amido. La differenza relativa tra la composizione della materia prima e quella dei prodotti finiti dipende ovviamente dall'efficienza con cui avviene la separazione degli strati più esterni della cariosside dall'endosperma; così una farina 0, alla quale corrisponde un tasso di estrazione di circa il 75%, contiene, rispetto a una farina integrale, il 5% della fibra, il 45% del grasso, il 30% delle sostanze minerali e una quota variabile tra il 15 e il 40% delle

1. Introduzione

diverse vitamine. Per contro, il contenuto di carboidrati, in particolare di amido, è superiore nella farina di circa il 10% . È ovvio che l'eliminazione del germe, ricco di acidi grassi insaturi tra i quali predomina l'acido linoleico, determina una diminuzione del valore nutrizionale del cereale, ma nel contempo incrementa la conservabilità degli sfarinati che facilmente potrebbero andare incontro a reazioni degradative a carico degli acidi grassi con sviluppo di rancidità nel prodotto, già dopo brevi periodi di conservazione. Anche l'eliminazione dei tegumenti, nella cui composizione predominano i costituenti della cosiddetta fibra dietetica, migliora la digeribilità, la conservabilità degli sfarinati, ma, soprattutto, le loro proprietà sensoriali.

La crusca

La crusca è il rivestimento del seme e ne costituisce il 10-20%. Contiene notevoli quantità di sostanze minerali e di cellulosa. Ha due strati ben distinti, uno esterno composto da fibre di cellulosa ricche di sali minerali e l'altro interno, costituito da pigmenti che danno alla crusca il colore bruno, ed assai povero di cellulosa. Lo strato dell'aleurone, che divide l'endosperma dalla crusca, è molto importante perché contiene proteine ad elevato valore biologico che con la macinazione si perdono nella crusca.

La crusca, formata da cellule con spesse pareti cellulari, è essenzialmente composta da:

frazione pentosanica (solubili e insolubili)	40%
cellulosa	27%
lipidi	1%
fibre	24%
proteine	8%

I tessuti periferici del chicco che ricoprono l'endosperma amidaceo che si sovrappongono sequenzialmente dall'esterno verso l'interno sono: il pericarpo esterno, il pericarpo interno (comprendente cross e tube cells), la testa, l'epidermide nucellare (hyaline layer) e lo strato aleuronico (figura 1.18.).

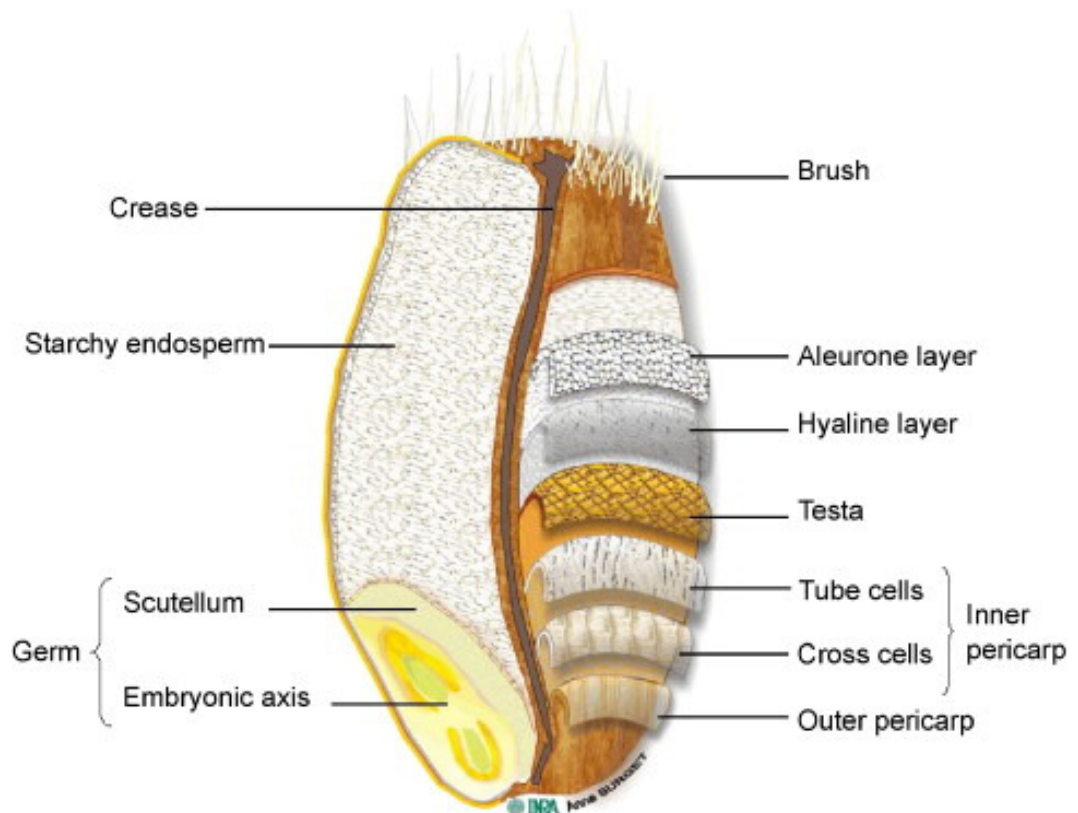


Figura 1.18.: Rappresentazione del chicco di grano e dei tessuti che compongono la crusca (da Surget and Barron, 2005)

La parte periferica del chicco è dunque una struttura multistrato nel quale i diversi tessuti di differente spessore sono strettamente associati tra loro (figura 1.19.). Lo strato aleuronico è il più spesso (fino a 65 μm) il pericarpo esterno ha spessore intermedio (15-30 μm) mentre la testa è il più sottile (5-8 μm).

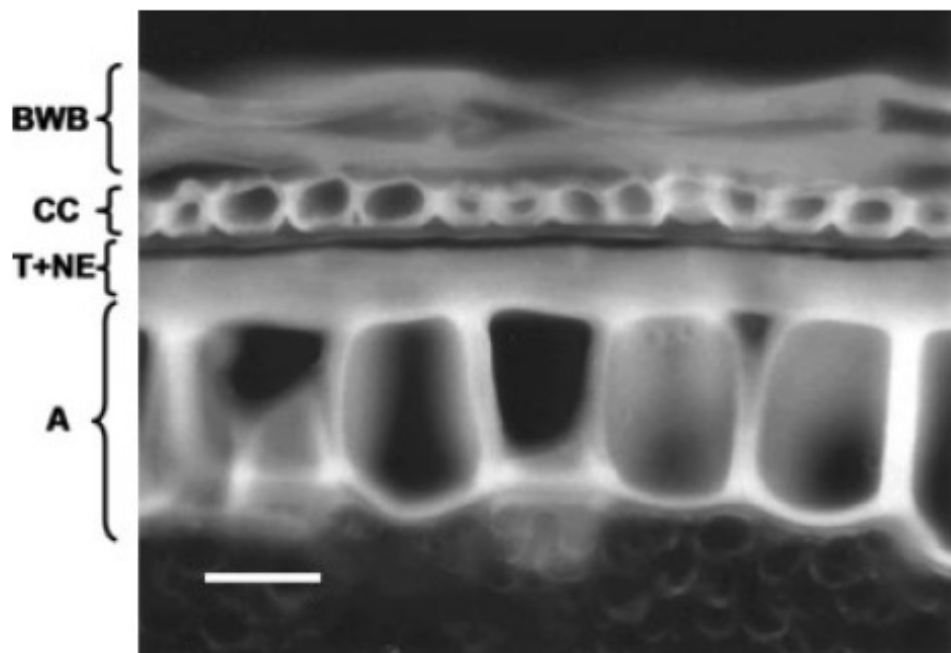


Figura 1.19.: immagine UVad autofluorescenza di crusca di grano. BWB, pericarpo esterno; CC, pericarpo interno; T + NE, testa + epidermide nucellare ; A, strato aleuronico. Barra, 10 μ m (da Parker *et al.* 2005).

Antoine e collaboratori 2003³² hanno determinato i carboidrati e i fenoli acidi nel pericarpo esterno e nello strato aleuronico, il che indica la presenza di elevate quantità di polisaccaridi delle pareti cellulari e in particolar modo di arabinoxilani in queste strutture. Più recentemente Parker *et al.* 2005³³ hanno incentrato la loro attenzione sulla composizione fenolica e zuccherina degli strati del pericarpo interno (comprendente cross e tube cells), della testa e dell'epidermide nucellare, dimostrando la netta prevalenza anche in questi strati di componenti arabinoxilatiche contenente fenoli acidi.

Una accurata dissezione dei diversi tessuti che compongono il chicco di grano e la determinazione puntuale delle componenti saccaridiche e fenoliche (tabella 1.5., 1.6.) di questi tessuti è stata riportata per la prima volta in maniera esaustiva da Barron *et al.*³⁴. Gli autori hanno mostrato che l'epidermide nucellare è composta solamente da carboidrati neutri composti esclusivamente da xilosio, arabinosio e glucosio che rappresentano il 75% del tessuto vegetale. Questa struttura è perciò composta da polisaccaridi della parete cellulare il 94 % dei quali sono arabinoxilani. Questo spiega l'elevata suscettibilità di questo tessuto all'idrolisi da xilanasi³⁵. La componente fenolica di questo tessuto è prettamente rappresentata da acido ferulico in forma monometrica con un basso grado di

1. Introduzione

cross-link dovuto a dimeri ferulici. L'impossibilità di liberare ulteriormente acido ferulico con un trattamento alcalino dopo la saponificazione del tessuto indica che non sono presenti eteri fenolici, molecole tipiche della giunzione tra strutture polisaccaridiche e ligniniche.

Tutte le strutture periferiche del chicco possono essere distinte da endosperma e germe per l'elevato contenuto in zuccheri neutri derivanti dalle strutture polisaccaridiche delle pareti cellulari, soprattutto arabinosio e xilosio. Il contenuto di cellulosa, struttura portante di tutte le pareti cellulari vegetali, è dedotto dal contenuto di glucosio dato che in questi tessuti non è presente amido. Strutture di 1-3 e 1-4 β -glucano sono soprattutto presenti nello strato aleuronico dove costituiscono circa il 23 % dei polisaccaridi della parete cellulare. La cellulosa è invece il principale costituente del pericarpo esterno e nello strato intermedio (epidermide nucellare, testa e pericarpo interno) rispettivamente il 25% e il 12 %³⁶.

A seconda del tessuto e della locazione nel chicco, gli arabinoxilani presenti nelle pareti cellulari presentano caratteristiche differenti. Lo strato aleuronico presenta arabinoxilani con un basso grado di cross-linking da diferulati³⁷. L'adiacente epidermide nucellare ha un basso rapporto arabinosio/xilosio (0,1) e il più elevato contenuto di acido ferulico esterificato con arabinosio mentre il pericarpo esterno ha un elevato rapporto arabinosio/xilosio (>1,1) e un basso contenuto di dimeri ferulici. La concentrazione di dimeri ferulici rilasciati tramite saponificazione non sembra differire significativamente per i diversi tessuti ma un più intenso trattamento alcalino in grado di idrolizzare anche i legami estere ha mostrato alcune differenze tra gli strati esterni del chicco. Lo strato aleuronico e l'epidermide nucellare non mostrano differenze nella quantità e tipologia di fenoli rilasciati dopo i due trattamenti basici ma nello strato intermedio e nel pericarpo esterno il trattamento alcalino aumenta di oltre 2 volte il rilascio di fenoli rispetto al trattamento di saponificazione.

La parte più esterna della crusca è molto ricca di cellulosa e se trattata con basi è la frazione, assieme allo strato intermedio, che rilascia la maggior quantità di dimeri e trimeri di acido ferulico. Questi rilasci sono indicativi di legami etere con fenoli acidi che risulta consistente con una significativa presenza di lignina tannini e cutina in questi tessuti³⁸.

1. Introduzione

Tabella 1.5.: Composizione in zuccheri neutri (mg 100 mg⁻¹ di tessuti) di crusca di grano da due cultivar (Caphorn and Crousty) (da Barron *et al.* 2007)

		Rham	Rib	Ara	Xyl	Man	Gal	Glu	Ara+Xyl	Ara/Xyl	Total
Whole grain	Caphorn	0.4	0.2	2.7	3.8	0.8	0.6	62.0	6.5	0.71	70.5
	Crousty	0.5	0.1	2.2	3.0	0.8	0.6	64.2	5.3	0.73	71.4
Starchy endosperm	Caphorn	0.5	0.2	0.8	1.0	0.6	0.3	74.4	1.7	0.81	77.6
	Crousty	0.6	0.2	0.7	0.8	0.5	0.4	78.1	1.5	0.87	81.2
Scutellum	Caphorn	0.3	0.2	4.5	3.4	0.0	0.9	2.7	7.9	1.31	12.0
	Crousty	0.0	0.2	4.7	3.4	0.0	1.2	3.5	8.1	1.39	12.9
Embryonic axis	Caphorn	0.0	1.1	8.5	6.3	0.8	2.0	2.8	14.8	1.35	21.5
	Crousty	0.0	0.9	8.6	6.4	0.9	2.1	3.1	14.9	1.35	22.0
Aleurone layer	Caphorn	0.0	0.0	7.7 (8.6) ^a	16.2 (19.6) ^a	0.4	0.7	9.4 (12.2) ^a	23.9 (28.3) ^a	0.47	34.3 (42.4) ^a
	Crousty	0.0	0.0	5.2 (6.2) ^a	12.5 (14.3) ^a	0.4	0.6	9.2 (11.4) ^a	17.6 (20.5) ^a	0.41	27.8 (34.0) ^a
Hyaline layer	Caphorn	0.0	0.0	6.3	60.6	0.0	0.0	4.6	66.8	0.10	71.4
	Crousty	0.0	0.0	5.9	47.2	0.0	0.0	4.2	53.1	0.13	57.3
Intermediate layer^b	Caphorn	0.0	0.0	11.9 (11.3) ^a	28.2 (28.1) ^a	0.0	1.3	3.1 (15.3) ^a	40.1 (39.4) ^a	0.42	44.4 (57.5) ^a
	Crousty	0.0	0.0	11.3 (11.0) ^a	26.5 (27.3) ^a	0.0	1.4	3.7 (16.1) ^a	37.7 (38.3) ^a	0.43	42.8 (57.0) ^a
Outer pericarp	Caphorn	0.0	0.0	25.4 (26.2) ^a	21.5 (21.6) ^a	0.0	1.4	1.6 (26.6) ^a	46.9 (47.8) ^a	1.19	49.9 (78.2) ^a
	Crousty	0.0	0.0	24.1 (24.9) ^a	21.3 (21.3) ^a	0.0	1.4	1.4 (25.1) ^a	45.4 (46.2) ^a	1.13	48.2 (73.8) ^a

^a Values obtained when a prehydrolysis step in 72% sulphuric acid is added. Standard error is less than 10%.

^b Composed of the hyaline layer+testa+inner pericarp.

1. Introduzione

Tabella 1.6.: Composizione in fenoli acidi di crusca di grano da due cultivar (Caphorn and Crousty) (da Barron *et al.* 2007)

		p-CA	SA	FAmomero	FAdimero	FAttrimero	FAm/Ara molar ratio (×100)	Xyl/FAd molar ratio	[phenol]/(Ara+Xyl) (%)
		(µg mg ⁻¹ of tissue)							
Whole grain	Caphorn	0.02	0.04	0.86	0.15	0.03	2.2	736	1.7
	Crousty	0.02	0.06	0.87	0.14	0.03	1.5	654	2.13
Starchy Endosperm	Caphorn	0.0	0.01	0.05	0.0	0.0	0.4	7354	0.36
	Crousty	0.0	0.01	0.04	0.0	0.0	0.2	6076	0.40
Scutellum	Caphorn	0.01	0.01	3.48	0.37	0.03	5.3	271	4.95
	Crousty	0.01	0.01	3.32	0.30	0.03	2.0	331	4.54
Embryonic axis	Caphorn	0.0	0.0	0.31	0.09	0.01	0.2	2053	0.28
	Crousty	0.0	0.01	0.57	0.10	0.01	0.2	1860	0.46
Aleurone layer	Caphorn	0.15	0.06	8.14	0.36	0.02	7.2	1299	3.66
	Crousty	0.16	0.08	7.98	0.31	0.02	7.4	1195	4.84
Hyaline layer	Caphorn	0.08	0.00	9.84	0.73	0.07	10.7	2417	1.61
	Crousty	0.09	0.00	10.83	0.46	0.02	11	3003	2.15
Intermediate layer^a	Caphorn	0.05	0.02	4.67	0.61	0.06	2.7	1359	1.35
	Crousty	0.06	0.04	4.96	0.59	0.06	2.1	1306	1.51
Outer pericarp	Caphorn	0.05	0.00	2.04	1.97	0.74	0.5	318	1.02
	Crousty	0.11	0.01	4.50	2.59	0.85	0.6	240	1.78

^a Composed of the hyaline layer+testa+inner pericarp. FAm values were calculated by summing (E)-FA and (Z)-FA content. FAd values were calculated by summing 8,5', 8-5' benzo, 8-O-4' and 5-5' diferulates contents. Xyl/FAd values were calculated by using Mw for diferulate of 386. Standard error is less than 10%.

1.5. L'acido ferulico

I biofenoli sono composti organici complessi costituiti da uno o più anelli aromatici variamente funzionalizzati con gruppi ossidrilici e molti altri composti di diversa natura come acidi organici a diversa insaturazione e zuccheri. La loro estesa presenza nel regno vegetale si deve al fatto che possono svolgere un'azione protettiva contro l'irraggiamento UV, gli attacchi dei patogeni e degli erbivori. L'attività antiossidante dei fenoli risiede nella capacità di essere ossidati facilmente in condizioni blande sia dai comuni ossidanti presenti in natura, come i radicali liberi, l'ossigeno e i perossidi, sia dalle radiazioni ultraviolette. L'attività antibatterica e antifungina dei fenoli è dovuta all'azione sinergica del potere antiossidante e del potere chelante dei gruppi ossidrili dell'anello fenolico che formano legami a idrogeno con le proteine della parete cellulare dei microrganismi. Alcuni fenoli, come gli esteri dell'acido gallico e *p*-idrossibenzoico, sono attualmente utilizzati come additivi alimentari per i motivi sopra citati, mentre altri, come l'idrochinone, fungono da schermanti contro le radiazioni UV e da *scavenger* di radicali liberi nelle creme dermatologiche utilizzate nel settore cosmetico.

Negli ultimi anni, i fenoli, grazie al loro potere antiossidante e batteriostatico, sono sempre più richiesti dall'industria cosmetica e alimentare come additivi ad alto valore aggiunto.

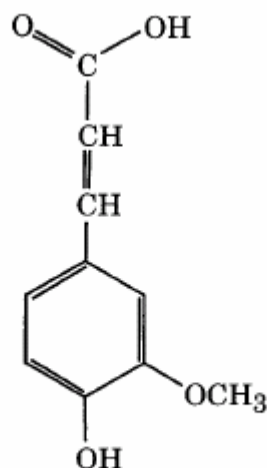
I biofenoli stanno fortemente attirando l'attenzione delle aziende che lavorano nel settore dei nutraceutici, cioè di sostanze che hanno sia carattere nutrizionale che farmaceutico. Nel mercato USA, dopo che è stata approvata nel 1994 la legge "*Dietary Supplement Health and Education Act (DSHEA)*", l'industria dei nutraceutici è tra i settori che crescono più celermente. Questo sviluppo è aiutato dalla distribuzione, infatti, i consumatori possono trovare i prodotti non più solo in negozi specializzati in cibi salutistici ma anche tramite i canali di vendita della grande distribuzione.

1. Introduzione

I nutraceutici, contenenti un'elevata quantità di antiossidanti, stanno riscuotendo un grande interesse per le industrie alimentari e farmaceutiche come alimenti per la "tutela della salute". Le reazioni ossidative del metabolismo umano, infatti, comportano una produzione di radicali liberi che deve essere controbilanciata da una serie di molecole definite antiossidanti. Su questa base i biofenoli rappresentano uno degli esempi più studiati poiché sono associati ad attività antiossidanti nei sistemi biologici³⁹. Molti autori hanno enfatizzato il ruolo dei biofenoli in relazione alla salute umana ed in particolare alla prevenzione ed alla cura di alcune forme tumorali⁴⁰.

L'acido ferulico (figura 1.20.) è un fenolo della classe degli acidi idrossicinnamici. E' presente ubiquitariamente nella struttura delle pareti cellulari vegetali dove svolge un ruolo strutturale di conservazione dell'integrità della parete. E' presente in elevate quantità nelle crusche di frumento e di mais dove può rappresentare sino al 4 % del peso secco della matrice vegetale ⁴¹. Gli acidi idrossicinnamici, oltre che nelle forme libere, sono più frequentemente presenti come esteri semplici di strutture polisaccaridiche (arabinoxilani). I gruppi ferulici possono dimerizzare formando legami a ponte fra le diverse catene polisaccaridiche (figura 1.12.) oppure legarsi con la lignina attraverso legami etere-estere formando così una struttura protettiva per l'attacco enzimatico delle catene di xilano. I cambiamenti strutturali della parete cellulare legati all'età o l'attacco microbico alle cellule delle piante possono condurre ad aumenti nel contenuto di acido ferulico.

1. Introduzione



Ferulic acid

Figura 1.20.: Struttura dell'acido ferulico (acido 3-(3-metossi-4-idrossifenil)-2-propanoico)

Attività antiossidante

In vitro sono state riscontrate attività di scavenging di diversi radicali liberi: $O_2^{\bullet-}$, $ABTS^{\bullet+}$ e $DPPH^{\bullet}$. La presenza di acido ferulico consente inibizione dell'ossidazione delle lipoproteine (LDL) da parte dei radicali presenti in soluzione⁴². I dati suggeriscono che l'acido ferulico possa avere delle applicazioni nella prevenzione dello sviluppo precoce dell'arteriosclerosi e di altri problemi di salute associati ai danni causati da radicali liberi.

Studi *in vitro* su cellule neuronali hanno dimostrato l'effetto protettivo di un pre-trattamento con acido ferulico 100 μ M nei confronti dello stress ossidativo indotto tramite trattamento con $FeSO_4$ 200 μ M. Il pre-trattamento con acido ferulico attenua gli effetti deleteri sulla vitalità e diminuisce l'apoptosi cellulare indotta con trattamento ossidativo⁴³.

In paesi come il Giappone è ammesso l'impiego di acido ferulico come antiossidante per alimenti e grazie alle sue molteplici attività e agli scarsissimi effetti indesiderati potrebbe trovare largo impiego anche in prodotti cosmetici e per la cura del corpo.

Attività antimicrobica

Come altri biofenoli l'acido ferulico ha mostrato attività inibitorie nei confronti di diverse specie microbiche. Tale composto, a concentrazioni di 0,27% (p/v), inibisce sviluppo microbico⁴⁴ di diversi ceppi di *Listeria monocytogenes*, un batterio patogeno capace di crescere su derrate alimentari, a pH >5. Alle stesse concentrazioni ma a pH di 4,5 l'acido ferulico risulta avere invece effetto battericida. Tale composto potrebbe convenientemente essere utilizzato come conservante naturale anche in campo alimentare, essendo comunque normalmente presente nella dieta.

Protezione dai raggi UV ed assorbimento cutaneo

L'acido ferulico possiede un'elevata capacità di assorbire radiazioni ultraviolette grazie all'elevato grado di coniugazione che conferisce alla molecola un'azione protettiva contro i raggi UV. La solubilità in acqua dell'acido ferulico è 0,71 mg/ml a pH 3, e sale sino a 6,63 mg/ml a pH 7. E' stata valutata la velocità di assorbimento dalla molecola sullo strato corneo dell'epidermide, che è risultata essere indipendente dal pH e compresa tra 1,18 e 1,45 $\mu\text{g}/\text{cm}^2\text{h}$ ⁴⁵. Lo stesso studio ha dimostrato che l'indice di eritema in pazienti sani dopo esposizione a raggi UV-B viene ridotto fino al 47% se la parte è successivamente trattata con acido ferulico.

Fertilità

L'acido ferulico ha mostrato effetti positivi sia sulla vitalità che sulla mobilità degli spermatozoi di soggetti sani e con problemi di fertilità a concentrazioni di 0,1-0,2 mM. Anche i livelli di perossidazione lipidica degli spermatozoi è ridotto in presenza di acido ferulico e per queste ragioni tale molecola potrebbe essere utilizzata come coadiuvante in terapie per il trattamento della infertilità maschile⁴⁶.

Circolazione e ipertensione

Effetti positivi sull'ipertensione a breve e a lungo termine sono stati osservati in topi da laboratorio. L'acido ferulico viene assorbito e risulta significativamente attivo nell'abbassamento della pressione sistolica in maniera dose dipendente (da 1 a 100 mg/kg di peso corporeo). Dopo una singola somministrazione di acido ferulico per via orale (50 mg/Kg di peso corporeo) la pressione sistolica raggiunge il livello minimi dopo 1h e torna ai livelli basali dopo 6h. La somministrazione prolungata (7 settimane) per via orale di 50 mg/Kg/g ha mostrato significativi effetti benefici sulla pressione sistolica delle cavie trattate rispetto al controllo. La somministrazione endovenosa di 0,5-1 mg/Kg di peso corporeo di acido ferulico ha portato ad una diminuzione del 20-30% della pressione arteriosa carotidea⁴⁷. Sono stati evidenziati inoltre effetti dell'acido ferulico (20-80 μ M) su colture cellulari di muscolo liscio che fanno ipotizzare effetti protettivi di tale molecola nei confronti delle malattie cardiovascolari⁴⁸.

Effetti antinfiammatori

Sono stati dimostrati gli effetti antinfiammatori e analgesici attribuiti dalla medicina tradizionale orientale all'acido ferulico. La concentrazione di acido ferulico in estratti di *Cimicifuga heracleifolia*, preparato utilizzato nella medicina tradizionale orientale, è pari a 74 ± 9 . Questo estratto è comunemente usato come antinfiammatorio, analgesico ed antipiretico ed è stato dimostrato che in vitro concentrazioni di acido ferulico 500 μ M causano l'inibizione dei macrofage inflammatory protein-2⁴⁹.

1.6. Il concetto di bioraffineria come valorizzazione integrata per il recupero di *chemicals* ed energia

Dalla valorizzazione di filiera alla bioraffineria

La ricerca di metodi di sfruttamento delle biomasse consente il passaggio dall'utilizzo di materie prime petrolchimiche verso risorse rinnovabili.

Mentre benzene e fenolo di sintesi continueranno ad essere importanti prodotti petrolchimici per il prossimo futuro, alcune resine fenoliche sono attualmente ottenuti da biomassa. L'utilizzo di materie prime da biomassa è già rilevante nella produzione di resine fenoliche utilizzate in prodotti come pannelli di legno compensato, pannelli di fibre media densità e laminati. Riscaldando la biomassa, principalmente truciolo di legni morbidi, si produce un olio di pirolisi, che, anche se contenente una miscela di molti materiali a base di fenolo, può essere usato per produrre resine fenoliche senza richiedere ulteriori depurazioni, in quanto ancora capace di polimerizzare. L'olio di pirolisi è generalmente usato in una miscela 50-50% con fenolo puro. La mancanza di una fase di purificazione riduce il costo energetico del processo, e il gas e il carbone ottenuti come sottoprodotti possono essere utilizzati come combustibile per il riscaldamento o la produzione di energia. Il risparmio complessivo può arrivare ad essere di oltre il 25%. Ricerche volta ad aumentare la percentuale di materie prime da biomasse sino al 100% per questa particolare applicazione sono in corso di svolgimento. Tuttavia, il limite di questo sistema è che solo fenoli utilizzabili nel settore dei polimeri sono ottenuti grazie a questi particolari processi.

Ci sono attualmente molti diversi progetti di ricerca e sviluppo che perseguono varie vie di approccio alla bioraffinazione delle biomasse. Solitamente però i processi e le tecnologie che vengono studiate e implementate sono estremamente specifiche per una singola filiera produttiva o per ottenere determinati prodotti. Inoltre la tendenza è quella di rifornire i sistemi di bioraffinazione con colture

1. Introduzione

dedicate: la “*whole crop*” *biorefinery* utilizza materie prime come cereali o mais; “*green*” *biorefinery* trasforma materiali come erba di sfalcio, trifoglio o cereali immaturi; mentre il “*lignocellulose feedstock*” *biorefinery* utilizza materie prime secche con un elevato contenuto di cellulosa, come la paglia, legno e scarti di cartiera. Questi sistemi di implementazione verticale delle filiere, anche laddove costituiscano una valida alternativa di valorizzazione, solitamente non consentono di risolvere in maniera efficace ed esaustiva il problema sei sottoprodotti agroindustriali.

Nonostante le potenzialità dei sottoprodotti del settore agroalimentare, il loro sfruttamento in bio-raffinerie su scala industriale è sempre stato ostacolato a causa di una serie di fattori logistici, tutt’oggi preponderanti per quanto riguarda la sostenibilità economica del processo di recupero dei fenoli come *secondary chemical building blocks*, e tecnologici:

- La stagionalità delle produzioni agroalimentari, che rende difficile integrare i suoi rifiuti in un processo integrato di bio-raffinazione;
- il fatto che i rifiuti agroalimentari hanno spesso una rilevante componente liquida, che introduce il problema del trasporto dei rifiuti esasperato da;
- una puntiforme distribuzione delle aziende agricole e delle industrie di trasformazione alimentare e nel territorio

Un approccio diverso è quello che si prefigge di produrre *chemical building blocks* fenolici per via estrattiva da biomasse che possono essere utilizzati per molti altri processi chimici e la sintesi di prodotti ad alto valore aggiunto.

Questo approccio propone un nuovo concetto di bioraffineria alimentata a sottoprodotti dell’agroalimentare, con l’obiettivo di sostituire parte delle materie prime oggi utilizzate in diversi processi produttivi, ottenute attraverso la sintesi da idrocarburi fossili, con i *secondary chemical building blocks* naturalmente presenti nelle biomasse. I fenoli ottenuti dagli scarti possono essere utilizzati come versatili intermedi per ottenere una vasta gamma di prodotti finiti: prodotti ad alto valore aggiunto per l’industria nutraceutica e cosmeceutica, prodotti di chimica fine per la farmaceutica e l’industria alimentare, polimeri fenolici per l’industria chimica etc. Questo approccio può essere definito come una “*whole*

1. Introduzione

crop” *biorefinery* che utilizza completamente tutti i diversi sottoprodotti del settore agroalimentare un permettendo la combinazione del recupero sostanze fenoliche, come principale obiettivo strategico, assieme all'estrazione di prodotti di chimica fine, bio-polimeri ed energia. In questo modo, la tecnologia di biraffinazione proposta esaurisce il problema della valorizzazione degli scarti agroalimentari sia sotto l'aspetto del contenuto chimico che energetico, tramite l'implementazione integrata di tecnologie enzimatiche e microbiche e chimiche.

Con il recupero di fenoli da rifiuti vegetali *secondary chemical building blocks*, si sviluppa concetto di bio-raffineria di validità generale, dal momento le diverse molecole estratte possono alimentare numerosi processi chimici. La tempistica di realizzazione di tale progetto è compatibile col tempo necessario alla ricerca per sviluppare tutte le necessarie tecnologie tenendo conto il pressante bisogno di alternative sostenibili rispetto all'impiego di idrocarburi fossili: a breve termine i biofenoli estratti potranno essere impiegati essi stessi come molecole ad elevato valore aggiunto in diversi settori; a medio termine potranno essere sviluppate tecnologie che, utilizzando i biofenoli estratti come materie prime, consentano di ottenere prodotti di sintesi per la chimica fine; a lungo termine, una volta raggiunta la stazionarietà del sistema estrattivo, ovvero il completo recupero di tutte le biomasse prodotte, i bio-building blocks fenolici potranno andare a sostituire le materie prime non rinnovabili in diverse applicazioni di chimica industriale come la produzione di resine fenoliche. Questo progetto rappresenta una risposta di validità generale per esaurire il contenuto fenolico, il saccharidico ed energetico delle biomasse agroalimentari.

Recuperare il contenuto energetico di rifiuti agroalimentari può svolgere un ruolo importante per supportare il fabbisogno energetico in Europeo. L'approccio di bio-raffineria proposto consente di coniugare la valorizzazione chimica con la valorizzazione energetica così da aumentare la fattibilità economica generale dei processi di valorizzazione dei rifiuti. Pertanto anche l'effetto della rimozione dei composti fenolici contribuirà ad aumentare le prestazioni delle fermentazioni per la produzione di biocarburanti come bioetanolo e biogas.

L'approccio tecnologico come soluzione alle limitazioni logistiche

La storia, il clima e le opportunità di mercato hanno portato ogni singolo paese Europeo a sviluppare diversi prodotti agricoli da cui si possono ricavare specifici *secondary chemical building blocks* fenolici. Uno dei principali obiettivi di questo progetto è quello di capire come diversificare e come individuare strategicamente piattaforme di bio-raffinazione, in modo da impostare un sistema economicamente sostenibile per la produzione di fenoli a livello locale, nazionale ed Europeo.

Questo approccio propone soluzioni per i ben noti problemi di bio-raffinazione di biomassa. Si tiene in conto il fatto che i sottoprodotti del settore agroalimentare in genere sono: 1) liquidi o solidi; 2) prodotti con specifiche stagionalità; 3) capillarmente distribuiti su tutto il territorio, 4) microbiologicamente e chimicamente instabili. Questo nuovo sistema di bioraffinazione deve essere flessibile per garantire un efficiente funzionamento di tutto il sistema. Una rappresentazione schematica del sistema di gestione dei sottoprodotti agroalimentari è riportato in figura 1.21. A seconda della tipologia di sottoprodotto e delle peculiari caratteristiche tecniche e tecnologiche necessarie per la completa valorizzazione chimica-energetica vengono studiati specifici accorgimenti logistici e processi tecnologici che possano massimizzare la sostenibilità del sistema.

1. Introduzione

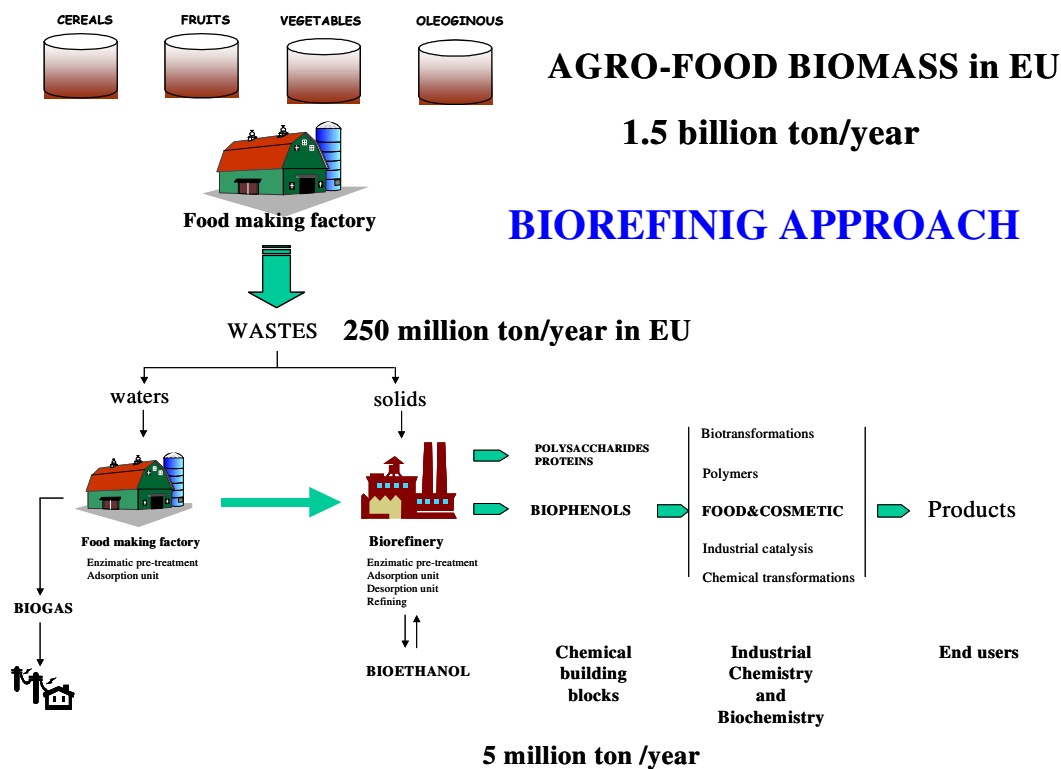


Figura 1.21: Schema di approccio integrato alla valorizzazione completa dei sottoprodotti dell'agroindustria tramite processi di bioraffinazione chimico-energetica

Al fine di recuperare le frazioni fenoliche dai diversi tessuti vegetali è necessario disgregare le matrici solide al fine di rendere le molecole d'interesse disponibili per gli step di recupero. Le tecniche di disgregazione dei tessuti vegetali prevedono attualmente l'utilizzo di trattamenti chimici (acidi, basi, solfito), e quelle di estrazione della componente fenolica dalle matrici vegetali ed in particolare da vinacce e vinaccioli, oggi sono essenzialmente basate su estrazioni con solventi organici come metanolo, etanolo, acetone oppure attraverso tecniche costose come i fluidi supercritici. Nel caso della crusca, processi di idrolisi acida o basica, consentono di ottenere il rilascio in soluzione acquosa di pentosani e sostanze fenoliche, ma tali processi presentano varie problematiche come l'utilizzo di sostanze pericolose, le alte concentrazioni di sali nei prodotti neutralizzati etc., e sono dunque difficilmente industrializzabili in impianti di facile gestione.

1. Introduzione

In seguito al processo di estrazione, inoltre, gli scarti devono essere trattati come rifiuti speciali, con conseguente elevato costo di smaltimento per l'estrattore, nonché elevate problematiche ambientali.

L'utilizzo di biocatalizzatori enzimatici per ottenere l'idrolisi delle strutture vegetali, al fine di recuperare la frazione fenolica, può costituire un'interessante alternativa rispetto ai processi chimici sia dal punto di vista economico che ambientale. Diverse specie microbiche, soprattutto fungine, producono normalmente enzimi idrolitici come xilanasi, pectinasi, aril-esterasi etc. al fine di aggredire le pareti cellulari vegetali piante.

Esistono ormai diversi prodotti commerciali utilizzati, per esempio, nell'industria della panificazione, della produzione di succhi e conserve, in enologia e nella produzione di birra, a base di enzimi idrolitici di diverso tipo. Questi prodotti sono ottenuti per via fermentativa da diverse specie di funghi, tra i quali i più diffusi appartengono ai generi *Aspergillus* e *Trichoderma*. Prodotti con elevate attività xilanasiche, amilasiche e cellulasiche possono consentire di disgregare le strutture polisaccaridiche delle matrici vegetali rilasciando polifenoli in soluzione. Biocatalizzatori enzimatici altamente efficienti, a basso costo e sicuri in quanto di grado alimentare rappresentano la tecnologia più interessante al fine di implementare una tecnologia di idrolisi delle matrici vegetali e rilascio della componente fenolica efficiente e a basso impatto per processi di bioraffinazione.

La principale soluzione logistica-tecnologica per evitare il trasporto di acque reflue, operazione estremamente dispendiosa dati gli ingenti volumi e la bassa concentrazione di biofenoli, consiste nello spostare il sistema tecnologico in due diversi impianti di lavorazione:

1) nel luogo di produzione del refluo liquido saranno allestiti impianti di pretrattamento ed estrazione della componente fenolica tramite processi di adsorbimento su resine polimeriche (unità locali). Le acque reflue saranno ulteriormente trasformate *in situ* con la conversione in biogas per la fornitura di energia. Il recupero del biogas è la tecnologia generalmente utilizzata nelle piccole e medie aziende agroalimentari, sparse sul territorio. In queste condizioni attualmente non vi sono alternative economicamente convenienti;

1. Introduzione

2) all'interno dell'impianto centralizzato di bioraffinazione avvengono i processi di estrazione e delle resine afferite dalle diverse unità locali sparse sul territorio. I fenoli estratti dai supporti solidi vengono poi inviati ad impianti di purificazione e finishing per l'ottenimento di chemical building blocks di purezza adeguata per i successivi utilizzi. All'interno della bioraffineria le resine saranno anche rigenerate e predisposte per il rinvio alle unità locali questa posizione centrale, in questo modo si abatteranno anche i costi di trasporto che diverranno paragonabili a quelli di afferimento dei reflui solidi rendendo economicamente più sostenibile l'intero processo. I sottoprodotti solidi, direttamente afferiti all'impianto di bioraffinazione, subiranno diversi processi di idrolisi, prettamente basati su tecnologie biocatalitiche enzimatiche al fine di abbattere i costi e l'impatto ambientale, per liberare la frazione fenolica in esse contenuta e renderla così disponibile per i successivi processi di estrazione. I reflui defenolato derivanti da tali trattamenti potranno essere convertiti in bio-etanolo, solvente necessario al processo di estrazione da resine, e, successivamente, in biogas per co-generazione di energia elettrica e termica necessaria alla bioraffineria stessa. Uno step intermedio di produzione per via fermentativa di biopolimeri potrebbe essere inserito a monte del processo di produzione di bioetanoli al fine di migliorare ulteriormente le performance economiche del processo di bioraffinazione.

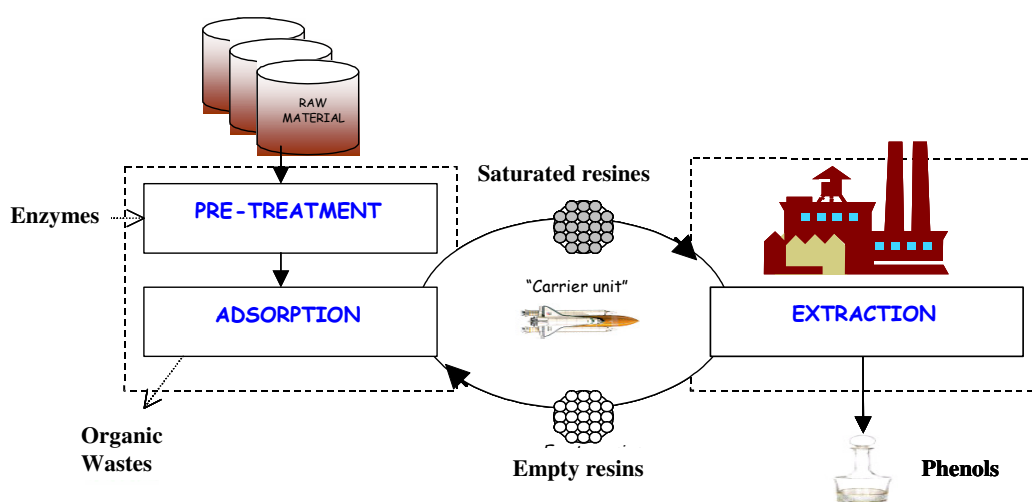


Figura 1.22.: Schema del processo di recupero della frazione fenolica da reflui liquidi delle produzioni agroindustriali basato su processi di adsorbimento e desorbimento su resine polimeriche.

1. Introduzione

Il collegamento tra le unità locali di produzione dei reflui e l'impianto centralizzato di bioraffinazione è garantito da tecnologie basate su resine polimeriche in grado di adsorbire selettivamente la frazione fenolica da diverse matrici ed in particolare è stata studiata presso i nostri laboratori per quanto riguarda le acque di vegetazione derivanti dalla molitura delle olive durante la produzione olearia (figura 1.22.). Le tecnologie per il recupero dei biofenoli dalle acque di vegetazione è stato sviluppato nell'ambito del progetto Europeo FAIR CT 97 3039, "Natural antioxidants from olive milling process" nel quale erano coinvolte 8 istituzioni di 4 nazioni Europee: Italia, Spagna, Francia e Portogallo.

La ricerca è stata sviluppata sia su scala di laboratorio che d'impianto pilota per la realizzazione di un processo chimico al fine di un recupero selettivo delle varie frazioni polifenoliche (biofenoli solubili SBP, biofenoli solubili-esterificati SEBP e biofenoli legati-insolubili IBBP) presenti nelle acque di vegetazione delle olive. Tra le varie tecniche d'adsorbimento (con carbone attivo, con gelatine animali, con matrici argillose, etc.) quelle che prevedono l'utilizzo di polimeri porosi hanno dimostrato una certa facilità di scale-up e semplicità operativa di sicuro interesse per le industrie del settore. La scelta tecnologica è stata orientata verso una tecnica d'estrazione d'adsorbimento/desorbimento dei fenoli solubili in acqua che si è dimostrata la più vantaggiosa dal punto di vista logistico, tecnico e ambientale. Durante la molitura, infatti, vi è una naturale ripartizione dei biofenoli solubili tra la fase oleosa e quella acquosa che contiene prevalentemente i biofenoli solubili esterificati e quelli insolubili. Il processo di desorbimento prevede la risospensione delle resine in un solvente etanologico acido nel quale si risolubilizzano i biofenoli. Finita la fase di desorbimento, le resine sono separate dal solvente tramite filtrazione e rinviate all'impianto d'adsorbimento mentre l'estratto alcolico è concentrato per distillazione. Il solvente distillato, neutralizzato con soda, può essere recuperato fino al 70-80%.

Dopo il recupero dei fenoli, la produzione di biopolimeri, biogas e bio-etanolo, l'esaurimento dei residui - in modo da chiudere completamente il ciclo di produzione - verranno definitivamente recuperati come rifiuti organici in appositi sistemi di raccolta e di trattamento (compostaggio tramite la digestione anaerobica), come fertilizzanti organici o ammendanti per uso agricolo.

2. SCOPO DELLA RICERCA

Scopo del presente lavoro di ricerca è sviluppare un processo di bioraffinazione della crusca di grano duro al fine di recuperare acido ferulico, molecola fenolica da utilizzare come *secondary chemical building block* in processi di ottenimento di *chemicals* ad alto valore aggiunto.

A tal fine sarà necessario caratterizzare la crusca oggetto del lavoro di ricerca tramite metodologie idrolitiche chimiche tradizionali per individuare la composizione delle diverse classi di zuccheri, proteine e biofenoli in essa contenute.

In seguito saranno preliminarmente valutati dei processi di idrolisi enzimatica della crusca al fine di individuare i parametri di processo ottimali per la risospensione della crusca in fase acquosa, gli eventuali pretrattamenti fisici, il tempo di contatto col biocatalizzatore, che consentano di ottenere una buona idrolisi del tessuto vegetale e una solubilizzazione in fase acquosa della frazione fenolica.

Si effettueranno poi delle caratterizzazioni puntuali delle attività più rilevanti di diversi preparati enzimatici commerciali al fine di valutare quali di queste attività sono le più importanti ai fini della liquefazione delle strutture delle pareti cellulari vegetali e della solubilizzazione della componente fenolica in esse contenuta. L'efficacia sul substrato reale dei preparati studiati, singolarmente e in combinazione, sarà valutata al fine di massimizzare l'efficienza del processo di rilascio in fase acquosa della componente fenolica contenuta nella crusca.

Saranno poi studiate delle tecnologie di estrazione della componente fenolica dagli idrolizzati di crusca ottenuti tramite i processi di idrolisi enzimatica sviluppati, basati su tecnologie di adsorbimento e desorbimento su resine polimeriche ad uso alimentare.

Si utilizzeranno poi gli estratti fenolici ottenuti in processi di ottenimento di biovanillina al fine di dimostrare l'applicabilità dei *secondary chemical building blocks* di derivazione naturale in processi industriali a basso impatto ambientale.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Determinazione dell'umidità nella crusca di grano

Su un crogiuolo di vetro, portato a peso costante e noto in stufa, si mettono circa 3g di crusca pesata esattamente. Si essicano i campioni in stufa, per un tempo di circa 5-6 ore, a temperatura costante di 120°C e dopo raffreddamento in essiccatore a silice si pesa fino ad ottenere un peso costante. La percentuale di umidità si calcola dalla perdita di peso⁵⁰.

3.2. Determinazione dei carboidrati totali (Metodo fenolo/solforico)

La procedura si basa sul metodo fenolo/solforico ricavata da una metodica di analisi dei carboidrati totali attraverso analisi spettrofotometrica^{51,52}.

Il metodo è quindi basato su di una retta di taratura costruita con soluzioni standard di D(+)-glucosio alle concentrazioni comprese tra 0,01-0,1 mg/ml.

A 200 µL di standard, posti in un tubo di reazione, si aggiungono 200 µL di soluzione acquosa di fenolo 5% p/v. Successivamente si aggiunge 1 ml di acido solforico conc. (98%p/p) e rapidamente si chiude il tubo di reazione. Dopo una energica agitazione si lascia sviluppare la reazione per 30 min a 30°C e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 490 nm contro un bianco costituito da 200 µL di H₂O distillata.

Dai valori di concentrazione degli standard e di assorbanza a 490 nm si costruisce una retta di taratura.

La retta in figura 3.1. è stata costruita operando un raffreddamento a 30 °C dei campioni all'interno dei tubi ma come si può osservare tale operazione non garantisce la linearità che si è invece ottenuta effettuando il saggio senza un raffreddamento dei campioni (figura 3.2).

3. Materiali e Metodi

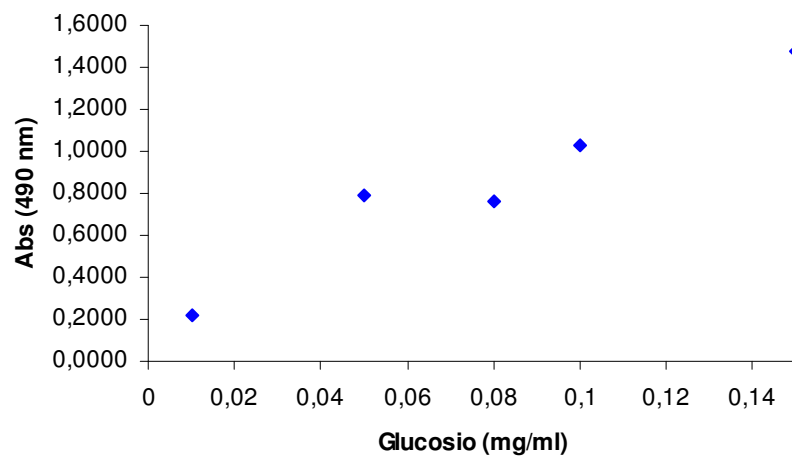


Figura 3.1.: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico e operando il raffreddamento a 30°C dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

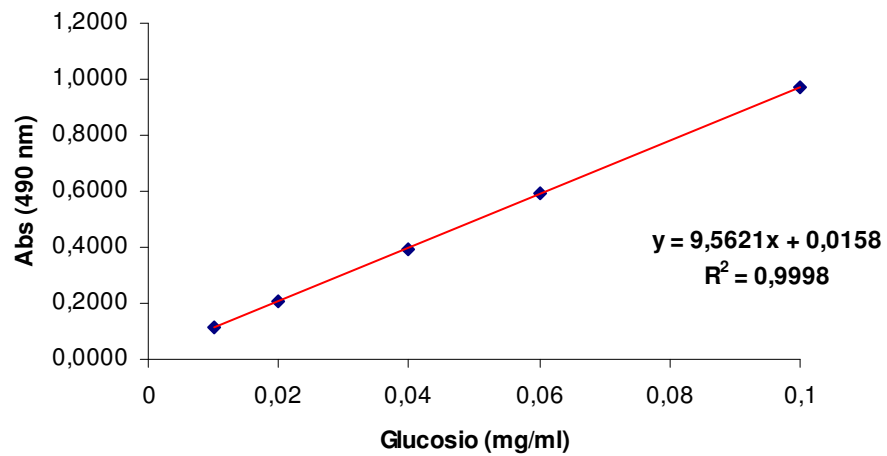


Figura 3.2: Retta di taratura per la determinazione dei carboidrati totali con il metodo fenolo/solforico non operando il raffreddamento dei tubi dopo aggiunta di acido solforico conc.

3. Materiali e Metodi

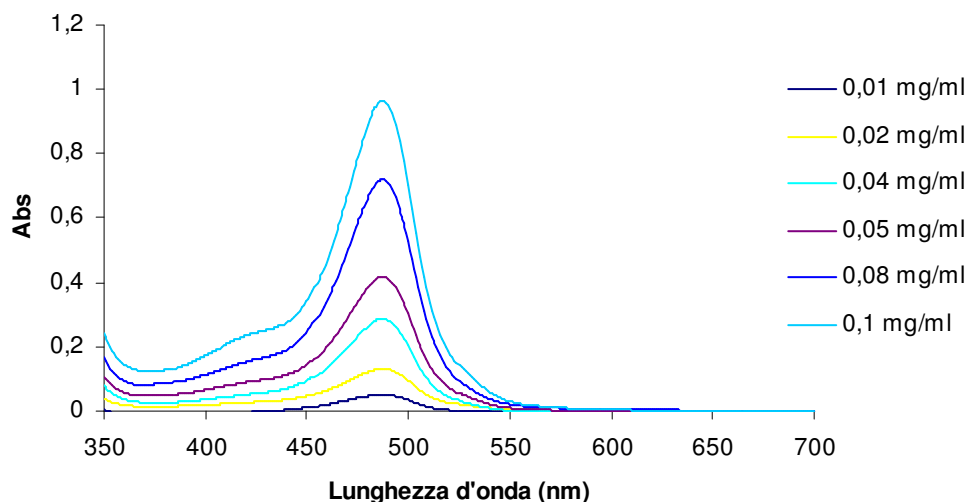


Figura 3.3.: Spettri di assorbimento (350-700nm) dei campioni di standard trattati con il metodo fenolo/solforico.

Come si può osservare in figura 3.3. gli spettri di assorbimento dei campioni di standard di glucosio dopo il saggio fenolo/solforico hanno un massimo di assorbimento a lunghezze d'onda di 490 nm e inoltre si ha una proporzionalità diretta tra assorbanza e concentrazione di glucosio e ciò è in linea con i risultati ricercati in letteratura⁵³.

La retta di taratura di figura 3.2., relativa agli spettri di figura 3.3., verrà utilizzata per le determinazioni sui campioni reali di estratto di fibra di frumento. Un'aliquota di estratto viene centrifugata e il surnatante, opportunamente diluito per ottenere concentrazioni rientranti nel range di linearità della retta di taratura, viene sottoposto al saggio nelle quantità di 200 μ l. Attraverso il saggio si hanno valori relativi alla quantità di carboidrati totali espressi come concentrazione di glucosio proveniente dall'idrolisi delle catene polisaccaridiche.

3.3. Determinazione dei pentosani (metodo del floroglucinolo)

La procedura utilizzata si basa su un metodo colorimetrico rapido e riproducibile con floroglucinolo come reattivo per la determinazione dei pentosani nelle farine di frumento⁵⁴.

Si preparano soluzioni acquose di D(+)-xilosio alle concentrazioni comprese tra 0,025 e 0,5 mg/ml. In un eppendorf da 1,5 ml a 0,2 ml di standard si aggiunge 1 ml di reattivo preparato al momento. Il reattivo è costituito dai seguenti composti:

3. Materiali e Metodi

- 11 ml di acido acetico glaciale;
- 0,2 ml di acido cloridrico conc. 37%
- 0,5 ml di soluzione di floroglucinolo 20%w/v in etanolo
- 0,1 ml di soluzione di D(+)-glucosio 1,75%w/v in acqua.

I tubi di reazione, una volta chiusi e agitati, vengono messi in bagno di acqua a 100°C per 25 min. Allo scadere del tempo si raffreddano rapidamente i campioni e si effettuano le letture di assorbanza a due lunghezze d'onda, rispettivamente 510 e 552 nm, contro un bianco costituito da 0,2 ml di H₂O distillata e 1 ml di reattivo.

La retta di taratura si costruisce riportando il valore della differenza tra assorbanza letta a 552 nm e a 510 nm in funzione della concentrazione corrispondente e si ottiene la retta riportata in figura 3.4.

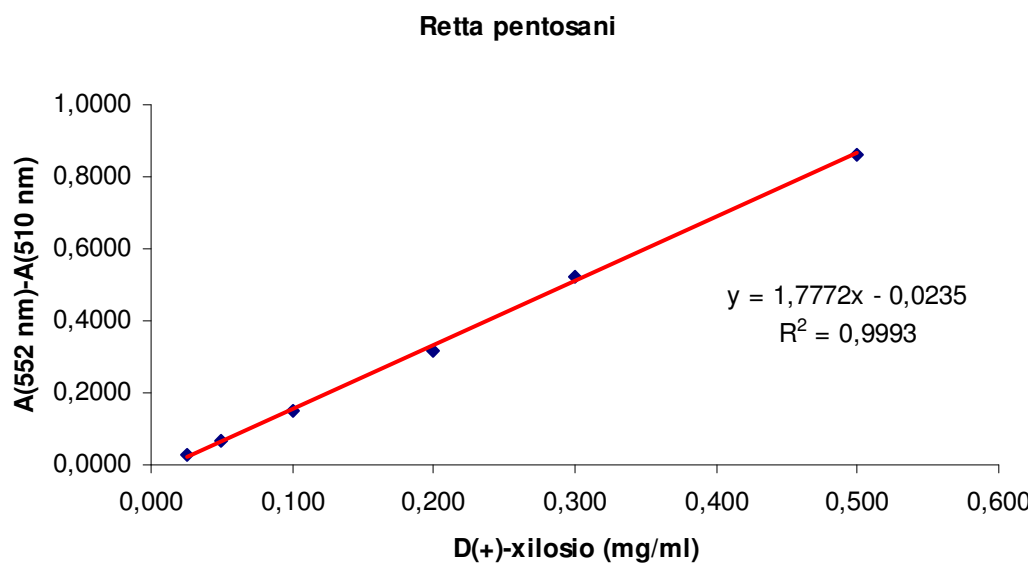


Figura 3.4.: Retta di taratura per la determinazione dei pentosani con il metodo che utilizza il reattivo floroglucinolo.

3. Materiali e Metodi

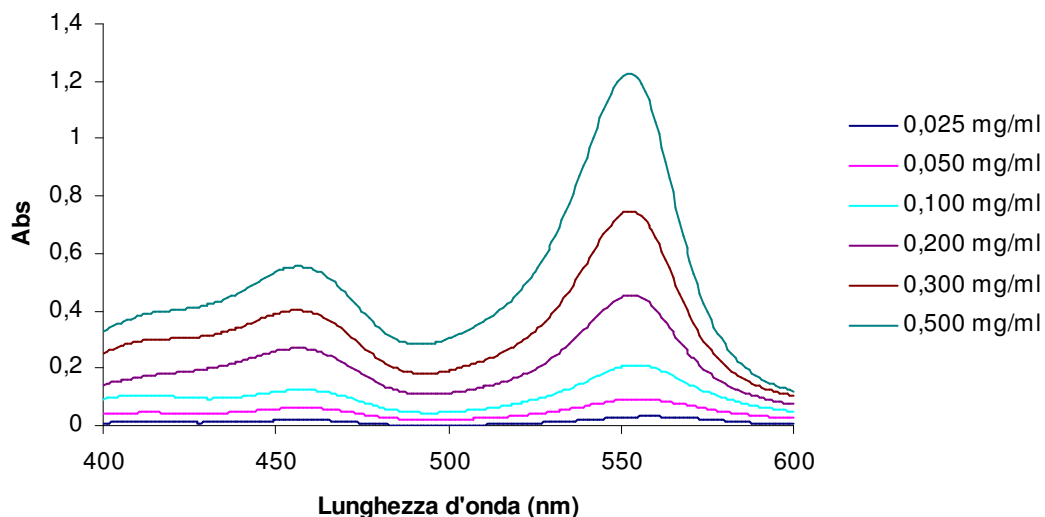


Figura 3.5.: Spettri di assorbimento (400-600nm) dei campioni di standard trattati con il metodo che utilizza il reattivo floroglucinolo.

In figura 3.5. sono riportati gli spettri di assorbimento dei campioni e come si può osservare si ha un massimo a 552 nm e un minimo a circa 510 nm. La retta di taratura si costruisce quindi con un valore di differenza di assorbenza e non un valore diretto .

3.3. Determinazione degli zuccheri riducenti (Metodo dell'ADNS)

La procedura è basata sul metodo di Bailey *et al.* 1992⁵⁵ e consente la determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS)*.

La reazione che avviene tra il reattivo ADNS e uno zucchero alla base del metodo è riportata in figura 3.6.

* 75g di sodio potassio tartrato vengono sciolti in 50 ml di NaOH 2M , portando a volume di circa 100 ml di acqua distillata. A questa soluzione si aggiungono 0,25 g di Acido DinitroSalicilico (la dissoluzione di ADNS è lenta ma non bisogna riscaldare, e nemmeno ricorrere al bagno ultrasuoni). Quando ADNS è perfettamente sciolto si porta a volume fino a 250 ml con H₂O distillata e si conserva a 4°C e al riparo dalla luce.

3. Materiali e Metodi

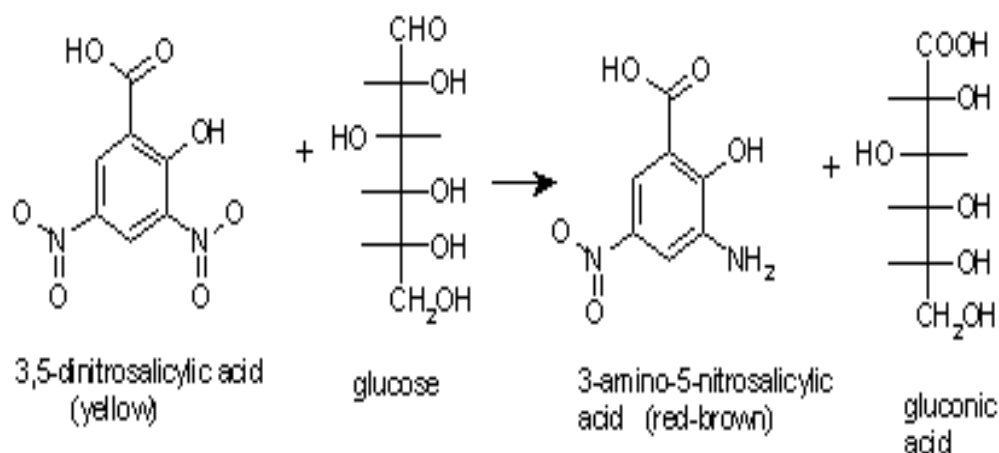


Figura 3.6.: reazione ossidoriduttiva fra glucosio e acido 3,5-dinitrosalicilico (giallo) con formazione di acido gluconico e acido 3-ammino-5-nitrosalicilico (rosso).

Lo zucchero preso come riferimento per costruire la retta di taratura è il D(+)-glucosio . La retta di taratura utilizzata per monitorare gli zuccheri si costruisce preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio (M.W. C₆H₁₂O₆ 180,16 g/mol) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in H₂O. A 400 µl di tali soluzioni si aggiungono 600 µl di ADNS. I campioni così preparati sono tenuti in acqua bollente per 7 minuti, centrifugati e l'assorbanza è letta a 550 nm contro un campione a concentrazione di zucchero nulla (bianco). La concentrazione di zuccheri riducenti espressa in mg/ml di glucosio si ottiene usando la retta di taratura riportata in figura 3.7.

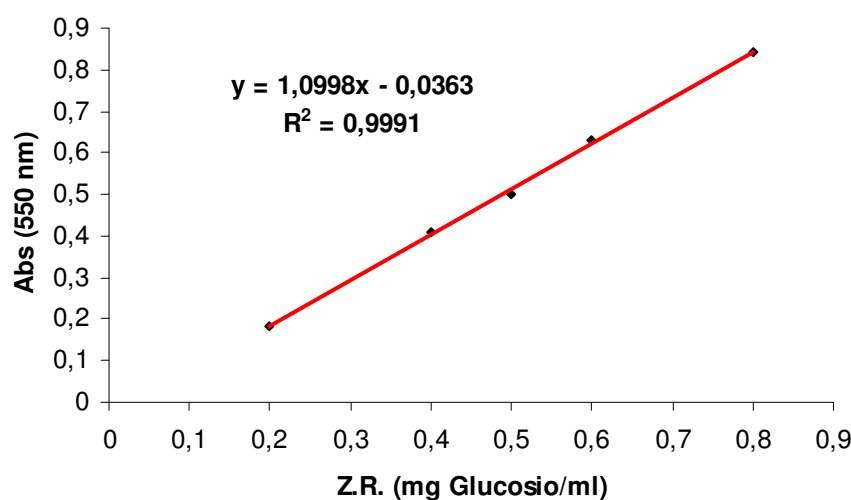


Figura 3.7.: Retta di taratura per la determinazione degli zuccheri riducenti nei campioni di estratti di fibra di frumento.

3. Materiali e Metodi

Per la determinazione degli zuccheri riducenti in soluzione nei campioni di idrolizzato di crusca si centrifuga il campione (5 min a 13000 rpm in eppendorf) e il surnatante dopo essere stato opportunamente diluito in acqua distillata viene impiegato nel saggio con le modalità sopra descritte.

3.4. Determinazione delle attività enzimatiche

Attività α -amilasica

La procedura per determinare l'attività amilasica si basa sul metodo descritto precedentemente (paragrafo 3.3) rilevando il rilascio degli zuccheri riducenti dovuto al trattamento enzimatico in una soluzione standard di amido monitorato tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). Inizialmente si costruisce la retta di taratura preparando soluzioni standard di D(+)-glucosio (M.W. $C_6H_{12}O_6$ 180,16 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0,2 a 0,8 mg/ml in H_2O . A 400 μ l di tali soluzioni si aggiungono 600 μ l di ADNS. I campioni così preparati sono tenuti in acqua bollente per 5 minuti, centrifugati e l'assorbanza è letta a 550 nm contro il campione a concentrazione di zucchero nulla (bianco). Le concentrazioni di glucosio in campioni incogniti si ottengono usando la seguente retta di taratura di Figura 3.7.

Il substrato di reazione viene preparato solubilizzando dell'amido solubile (Sigma) 1% p/p, scaldando la soluzione fino a circa 60°C e lasciandola successivamente sotto agitazione magnetica per 12 ore a 25°C. A 3,6 ml di substrato sono aggiunti 0.4 ml di soluzione enzimatica opportunamente diluita e incubando a 30°C per 10 minuti. La reazione è fermata aggiungendo ad un'aliquota di 0,4 ml di soluzione enzimatica 0,6 ml di ADNS e mettendo il tube di reazione (eppendorf) in acqua bollente per 7 minuti. Il bianco è preparato utilizzando 0.4 ml di soluzione enzimatica inattivata tramite 10 minuti di bollitura. I campioni sono letti, dopo centrifugazione, contro il bianco a 550 nm.

3. Materiali e Metodi

Attività xilanasica

Per determinare l'attività xilanasica ci si è basati sul metodo descritto da Bailey *et al.* modificandolo leggermente. La procedura si basa sulla determinazione spettrofotometrica degli zuccheri riducenti liberati tramite reazione ossidativa con acido 3,5 dinitrosalicilico (ADNS). Si costruisce la retta di taratura preparando soluzioni standard di xilosio (M.W. 150.13 g/mol) (Sigma) a concentrazioni da 0 a 1 mg/l in tampone di Mc Ilvaine a pH 4.8. A 400 µl di tali soluzioni si aggiungono 600 µl di ADNS. I campioni così preparati sono tenuti in acqua bollente per 5 minuti, centrifugati e l'assorbanza è letta a 550 nm contro il campione a concentrazione di zucchero nulla.

Le concentrazioni di xilosio liberato si ottengono usando la retta di taratura riportata in figura 3.8.

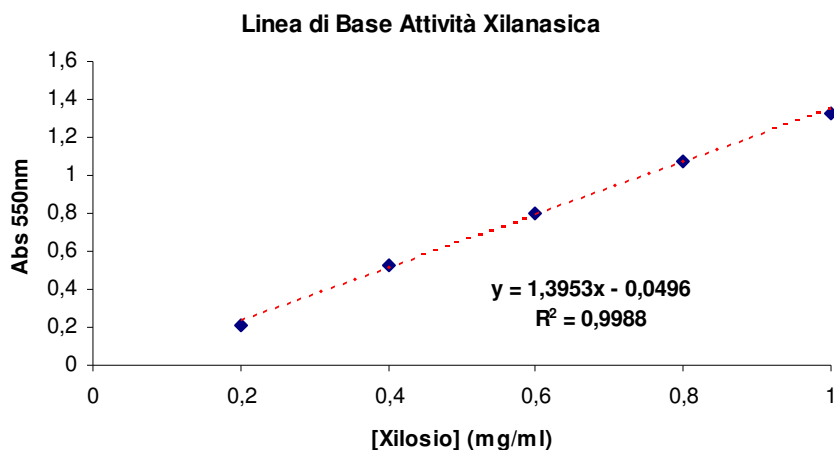


Figura 3.8.: Retta di taratura per la determinazione dell'attività xilanasica.

Per la determinazione dell'attività xilanasica si è usata la seguente procedura: si preparano i substrati per il saggio sciogliendo 1.0 g di xilano (from oat spelts, Sigma) in 100 ml di tampone di Mc Ilvaine pH 4.8, si porta ad ebollizione e si lascia sotto agitazione magnetica per 12ore a temperatura ambiente. A 3,6 ml di substrato sono aggiunti 0,4 ml di soluzione enzimatica diluita 100 volte e s'incuba a 30°C per 10 minuti. La reazione è fermata aggiungendo 6ml di ADNS e

3. Materiali e Metodi

mettendo le provette in acqua bollente per 7 minuti. Il bianco è preparato utilizzando 0,4 ml di soluzione enzimatica inattivata tramite 10 minuti di bollitura. I campioni sono letti, dopo centrifugazione, contro il bianco a 550 nm.

Attività glucosidastica

La determinazione dell'attività glucosidastica è condotta utilizzando come substrato l'orto-nitrofenil β -D glucopiranoside ⁵⁶ (ONPG) (Sigma). L'enzima idrolizza il legame β -1,4-glucosidico liberando l'o-nitrofenolato (ONF) che sviluppa una colorazione gialla dosabile spettrofotometricamente a 420 nm con un coefficiente d'assorbimento di $18300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

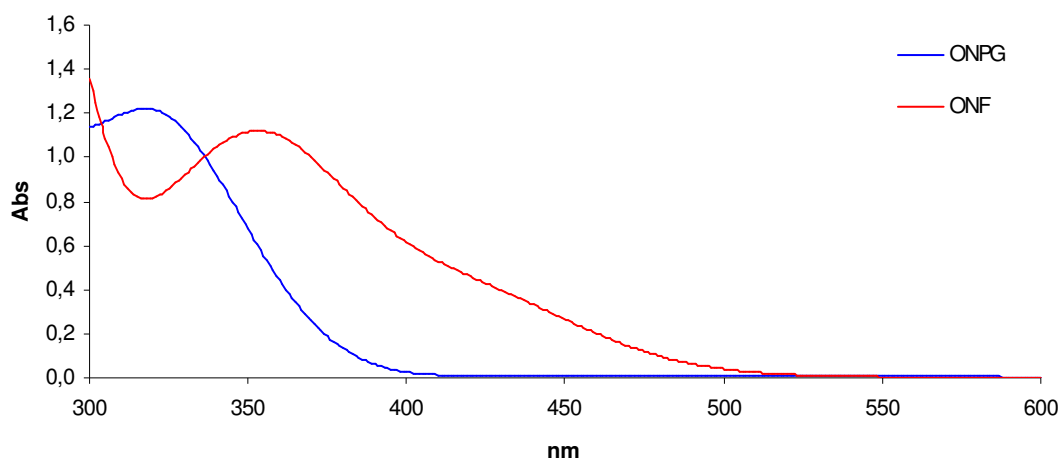


Figura 3.9.: Spettri di assorbimento dell'ONPG e d'ONF.

Dalla figura 3.9. si può osservare che il massimo d'assorbimento dell'ONF è intorno a 350 nm. Si è preferito utilizzare come lunghezza d'onda alla quale leggere i corrispondenti valori d'assorbimento quella di 420nm, poiché in queste condizioni il substrato (ONPG) non presenta nessuna assorbimento. I campioni sono preparati con 3 ml di tampone fosfato 25 mM, pH 6.5; 0.5 ml di orto-nitrofenil glucopiranoside (ONPG) (Sigma) 15 mM (0.0225g in 5 ml) e 0.5 ml di soluzione enzimatica (0.5 ml di acqua per il bianco). I campioni sono incubati a 30 °C per

3. Materiali e Metodi

15 min e la reazione è fermata con 0.5 ml Na₂CO₃ 10 % w/v. Si eseguono le letture contro il bianco a 420 nm e le concentrazioni si ricavano dalla formula di Lambert-Beer:

$$\text{Abs}_{\lambda=420} = \epsilon * [c] * l$$

$\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ l = cammino ottico $[c]$ = nitrofenolo rilasciato in mol/l

Attività cinnamoil esterasica

La cinetica di formazione degli acidi cinnamici⁵⁷, ferulico e caffeico, dai relativi metil esteri può essere determinata spettrofotometricamente misurando la variazione d'assorbanza a 335 nm come descritto di seguito.

Ad una solizione enzimatica opportunamente diluita è aggiunto tampone fosfato 100 mM pH 6.0 e con concentrazione di substrato 0.1 mM sino ad un volume finale di 1 ml. L'attività enzimatica è calcolata secondo l'equazione:

$$\text{Attività } (\mu\text{mol min}^{-1}) = \Delta \text{ Abs} / (\text{min} * \epsilon)$$

Dove ϵ è uguale a $0.0093 \mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ per il metilferulato e $0.0065 \mu\text{mol}^{-1}\text{min}^{-1}$ per il metilcaffeato.

L'attività esterasica di un enzima nei confronti di esteri tipicamente presenti nella struttura della parete cellulare come ferulati (Figura 3.10) e caffeati (Figura 3.11.) può essere determinata nel modo descritto.

3. Materiali e Metodi

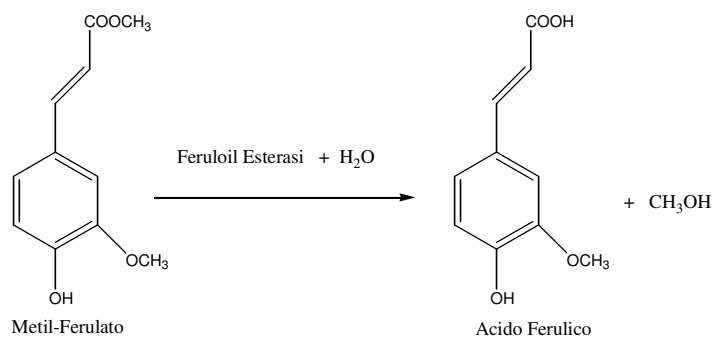


Figura 3.10.: Reazione idrolitica su metil-ferulato di una feruloil esterasi.

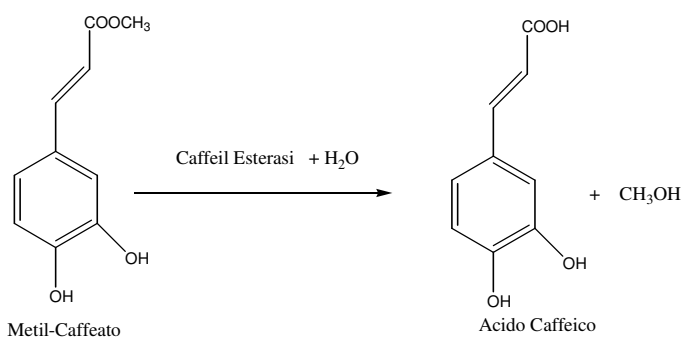


Figura 3.11.: Reazione idrolitica su metil-caffeato di una caffeil esterasi.

Attività laccasica⁵⁸

Per determinare l'attività laccasica è stato utilizzato il metodo di Setti *et al.*⁽³³⁾ basato sull'accoppiamento ossidativo tra il 3-metil 2-benzotiazolinone idrazone (MBTH) e l'orto-metossifenolo (guaiacolo Sigma). La reazione di accoppiamento ossidativo è mostrata in figura 3.5.

3. Materiali e Metodi

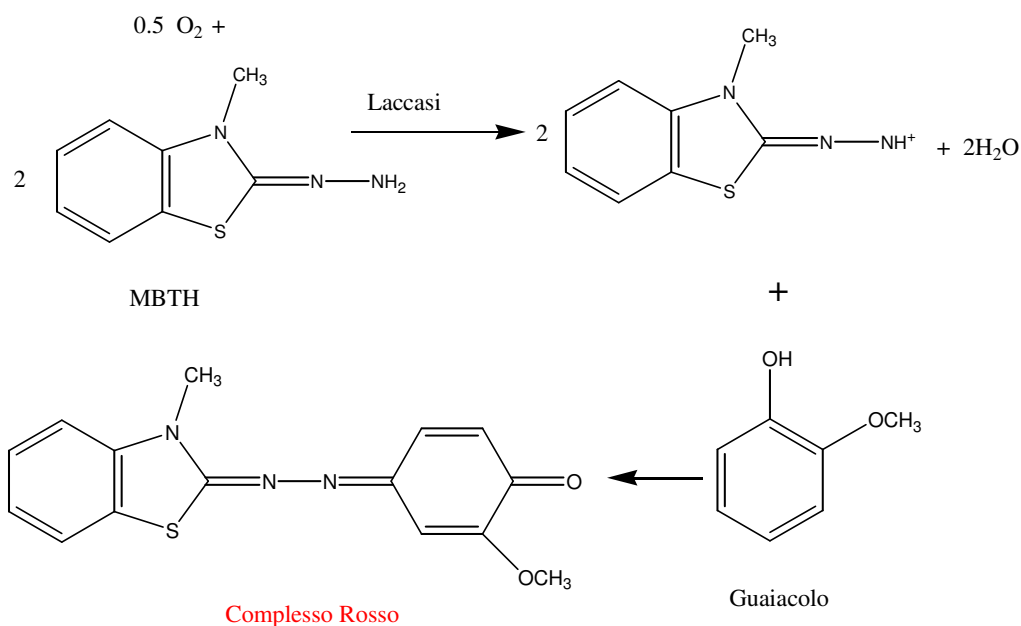


Figura 3.12.: reazione di accoppiamento ossidativo tra MBTH e guaiacolo per la determinazione dell'attività laccasica.

I campioni sono preparati aggiungendo a 3 ml di tampone fosfato o fosfato-citrato 25 mM a pH arbitrario secondo le esigenze, 500 μ l di MBTH (Aldrich) 0.05% w/v, 50 μ l di guaiacolo (Merck) 500 mM in etanolo (1.116 ml in 20 ml volume finale) e 300 μ l di soluzione enzimatica (il bianco è preparato allo stesso modo, ma senza guaiacolo). I campioni sono incubati a 30 °C per 20 minuti. La reazione è fermata aggiungendo in rapida successione 500 μ l di H₂SO₄ 1 N e 1 ml d'acetone. Dopo centrifugazione i campioni sono letti a 502 nm contro il bianco e l'attività è calcolata con la formula:

$$\text{Attività (mmol/min)} = \frac{\text{Abs}_{502 \text{ nm}} * 10^{-3} * V_{\text{tot}}}{t * \epsilon * l * V_{\text{Enz}}}$$

Dove:

$\text{Abs}_{502 \text{ nm}}$ = Assorbanza (502 nm) t = Tempo di reazione (minuti)

ϵ = Coefficiente d'estinzione molare 8.355 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$

V_{tot} = Volume totale di reazione (ml) V_{Enz} = Volume enzima aggiunto (ml)

3. Materiali e Metodi

3.5. Determinazione delle proteine totali (Metodo di Bradford)

Per la determinazione delle proteine totali viene utilizzato un semplice saggio colorimetrico che utilizza il reattivo do Bradford. La retta di taratura è costruita con soluzioni standard di BSA (albumina di siero bovino) alle concentrazioni di 0,1-0,5 mg/ml che si preparano dalla soluzione madre alla concentrazione di 1 mg/ml. In una provetta si introducono 5 ml di reattivo di Bradford diluito 5 volte e successivamente 0,1 ml di campione standard di BSA. Si lascia sviluppare il colore per un tempo di circa 5 min e successivamente si effettuano le letture di assorbanza alla lunghezza d'onda di 595 nm contro un bianco costituito da acqua distillata e 5 ml di reattivo.

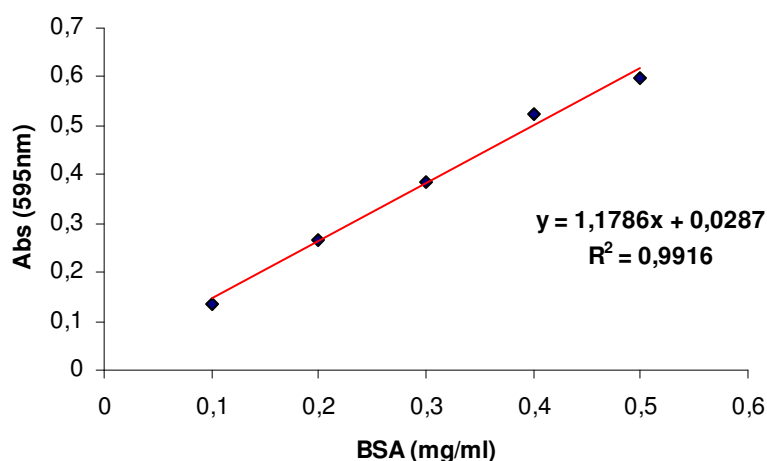


Figura 3.12.: Retta di taratura per la determinazione delle proteine totali con il metodo di Bradford.

3.6. Determinazione spettrofotometrica dei polifenoli totali⁵⁹ (Metodo di Folin-Ciocalteu)

Si preparano 5 soluzioni di catechina (Sigma), utilizzata come polifenolo di riferimento, in metanolo a concentrazioni comprese tra 20 e 300 mg/l. In matracci da 20 ml, ad 1 ml di ciascuna soluzione, sono aggiunti: 1 ml di metanolo, 5 ml

3. Materiali e Metodi

d'acqua, 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10% w/v. Si porta a volume con acqua distillata e si legge l'assorbanza a 700 nm dopo 90 minuti d'incubazione a 30°C.

La concentrazione di polifenoli in soluzione è calcolata tramite la seguente retta di taratura (figura 3.1.):

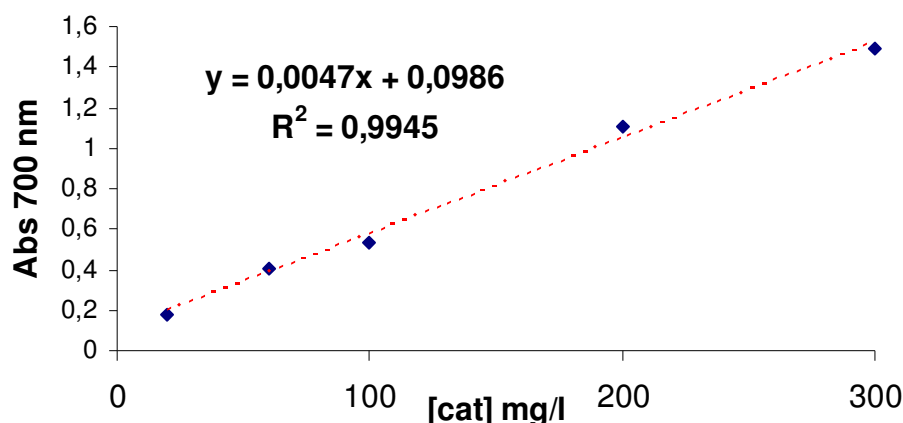


Figura 3.13.: Retta di taratura per la determinazione dei polifenoli totali a 30°C.

$$[\text{Polifenoli}] \text{ (mg/l)} = \text{Abs}_{700 \text{ nm}} * 212.8 * l \text{ (cammino ottico)}$$

Per la determinazione dei polifenoli totali nelle acque di vegetazione, al fine di eliminare sostanze organiche che possono interferire nella lettura, si effettua un passaggio in cartuccia C-18 end-capped, Phenomenex-Strata, 1.0g/6ml, secondo il metodo descritto di seguito:

Si lava la cartuccia con 2 ml di metanolo e si condiziona con 5 ml d'acido solforico 0.01 N. Si adsorbe 1 ml di campione, opportunamente diluito in acido solforico 0.1 N per ottenere un'assorbanza compresa nel range della retta di taratura, e si aggiungono 2 ml d'acido solforico 0.01 N. Si collega la cartuccia ad un matraccio da 20 ml e si eluisce con 2 ml di metanolo e 5 ml d'acqua distillata. Al contenuto del matraccio si aggiunge 1 ml di reattivo di Folin-Ciocalteu e, dopo 5 minuti, 4 ml di carbonato di calcio 10 % w/v portando poi a volume con acqua. Dopo 90 minuti si legge l'assorbanza a 700 nm, avendo cura di

3. Materiali e Metodi

centrifugare il campione per sedimentare il precipitato di carbonato che si forma, contro un bianco preparato in un matraccio da 20 ml contenente tutti i reagenti e 2 ml di metanolo non contenente fenoli.

3.7. Determinazione del potere antiossidante totale⁶⁰

1,5 mL di una soluzione 0,1 mM in metanolo di 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl DPPH (Sigma) vengono inseriti in provetta e aggiunti di 0,5 mL di campione opportunamente diluito. Il controllo è costituito da 1,5 mL di DPPH e 0,5 mL di acqua distillata. Preparati i campioni in provette, queste, sono tappate al fine di limitare l'evaporazione del solvente, agitate vigorosamente per pochi secondi e poste in un ambiente buio per di 60 min. Si eseguono letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 517 nm contro il controllo.

3.8. Determinazione del contenuto in acido ferulico degli idrolizzati enzimatici tramite HPLC

È stata preparata una soluzione madre di acido ferulico a 1000 ppm, utilizzando come solvente metanolo per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale. La soluzione è stata poi opportunamente diluita nello stesso solvente in modo da ottenere soluzioni contenenti concentrazioni di acido ferulico pari a 2,5-5-10-15-20 ppm.

Le soluzioni così ottenute sono state sottoposte ad analisi HPLC.

Il volume di campione iniettato è di 20 µl, le fasi mobili, la colonna utilizzata ed il metodo HPLC utilizzato vengono descritti di seguito.

Fase Mobile A: acqua per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale e un 2% di acetonitrile per HPLC.

Fase Mobile B: acetonitrile per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale.

Colonna: Luna 5u Phenyl-Hexyl 150x3.0 mm 5.00±0.30 µm

Velocità di flusso: 1ml/min

3. Materiali e Metodi

Gradiente:

STEP	% FASE A	% FASE B	TEMPO (min)
0	96	4	/
1	96	4	10
2	70	30	20
3	0	100	25
4	0	100	30
5	96	4	35

Per ogni soluzione di acido ferulico è stato registrato il corrispondente cromatogramma dal quale si è potuta determinare l'area del picco ed il tempo di ritenzione dell'acido, in modo da poter costruire una retta che mettesse in relazione area del picco del ferulico con la concentrazione corrispondente.

In questo modo si è ottenuta la retta di taratura riportata in figura 3.14.

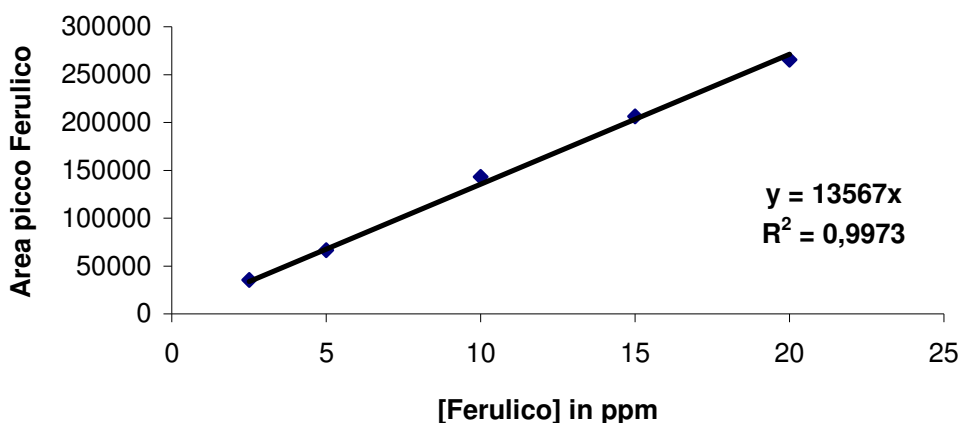


Figura 3.14.: Retta di taratura dell'acido ferulico.

Per la determinazione dell'acido ferulico in campioni reali, si diluisce opportunamente il campione in metanolo per HPLC con uno 0,5% di acido acetico glaciale. I campioni diluiti vengono filtrati su carta tipo Whatmann 100 100µm ed iniettati seguendo la procedura precedentemente descritta

3.9. Preparazione della resina e processo di adsorbimento e desorbimento

L'adsorbimento dei polifenoli è effettuato in un recipiente sigillato sottoposto ad agitazione meccanica trasversale in cui alla crusca è aggiunto il 6 % p/v d'Amberlite IRA 95 (Rohm & Haas). La resina è attivata/rigenerata seguendo la seguente procedura:

- 100 g di resina sono messi in una colonna (h 400 mm, Ø 25 mm) e coperti d'acqua distillata e lasciati idratare 24 ore;
- si fluisce, alla velocità di flusso di 8-10 ml al minuto, la resina con 1200 ml di acqua distillata e con HCl 1M sino al rilevamento allo spettrofotometro, in seguito all'analisi dell'eluato, di un segnale nullo tra 200 e 400 nm;
- si fluisce alla velocità di flusso di 8-10 ml al minuto con acqua distillata sino al raggiungimento di un pH di 4,0 dell'eluato;
- la resina è sgocciolata e posta in stufa a 60°C sino a completa essiccazione.

L'adsorbimento dei polifenoli viene effettuato con un rapporto fra resina IRA 95 e crusca (con acqua nel rapporto 1:7) pari al 6%p/v . In questa fase di 24 ore i polifenoli contenuti nella soluzione acqua crusca sono adsorbiti sulla resina.

La resina è poi separata per decantazione e sottoposta a desorbimento con etanolo al 95% con 1% HCl conc. a riflusso per 1 ora. Il volume della soluzione etanolo acido cloridrico è tale da mantenere costante la quantità di resina ma avere un diverso rapporto resina/solvente. La resina desorbita è infine allontanata per decantazione e stoccata per essere rigenerata come sopra descritto, gli estratti idroalcolici vengono successivamente stoccati.

3.10. Determinazione del contenuto di lignina

La lignina è stata determinata usando la procedura descritta da Jay *et al.* 2008⁶¹. Il campione (500 mg) è trattato con 7,5 ml di acido solforico (72% p/p) per 3 ore a 20°C. Si aggiungono poi 90 ml di acqua deionizzata, si agita e si incuba per 2,5 ore a 100 °C a riflusso. Il residuo è recuperato tramite filtrazione

3. Materiali e Metodi

sotto vuoto in un imbuto con setto il vetro sinterizzato precedentemente pesato. Il solido viene lavato tre volte con acqua deionizzata tiepida sino ad allontanare completamente l'acido dal residuo. L'imbuto viene poi posto ad essiccare in forno a 50 °C sino al raggiungimento di peso costante.

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1. Prove preliminari di idrolisi della crusca di grano

Al fine di studiare il processo di bioraffinazione dei sottoprodotti dell'industria cerealicola si è scelto come substrato di lavoro della crusca di grano duro acquisita da Molino Grassi S.p.A. (Fraore, Parma). Tale crusca ha mostrato un contenuto di umidità del 12-13%.

Al fine di conoscere meglio la matrice in oggetto si è deciso di effettuare una serie di test preliminari di idrolisi chimica ed enzimatica al fine di ottimizzare il sistema per le prove successive e poter comparare il processo chimico tradizionale con quello biocatalitico.

Idrolisi chimica della crusca di grano

Si è preliminarmente valutato il rapporto di diluizione ottimale da utilizzare per risospendere la crusca nelle varie estrazioni. Inizialmente è stato adottato un rapporto crusca:acqua di 1:5 p/p come descritto in lavori simili presenti in letteratura⁶². Dopo la preparazione della soluzione si è notato che la sospensione ottenuta risultava troppo viscosa e di difficile miscelazione, si è deciso quindi di aumentare il rapporto crusca:acqua a 1:10 p/p. In queste condizioni si ha un campione di facile miscelazione e si ottiene un estratto liquido facile da separare e analizzare.

Sono state effettuate delle prove di destrutturazione della fibra attraverso trattamenti chimici con acidi (HCl, H₃PO₄, H₂SO₄) e una base (NaOH) per valutare l'efficacia di tali trattamenti sul rilascio in soluzione di carboidrati totali e pentosani. Le prove, effettuate utilizzando diverse concentrazioni di acidi e basi, sono state monitorate incubando i campioni a 30°C in agitatore orbitale (30 rpm)

4. Risultati e Discussione

per diversi giorni al fine di verificare il rilascio di zuccheri in soluzione come indice di idrolisi della matrice.

Aumentando la concentrazione della soluzione acida per HCl o H₂SO₄, entrambi acidi forti, si ha un aumento della concentrazione di carboidrati totali in soluzione Figura 4.1.. A concentrazioni di 0,01M, per tutti gli acidi usati, si hanno pH di 5-6 e quindi condizioni favorevoli allo sviluppo delle popolazioni microbiche presenti nella crusca come dimostrato dal calo della concentrazione di zuccheri riportato in figura e da una diminuzione del pH che in 24 h si attesta attorno a 4. Anche in acqua e a concentrazioni 0,01 M di NaOH (Figura 4.2.) si ha un calo dei carboidrati totali correlato ad una diminuzione del pH analoga a quella riscontrata per i campioni trattati con acidi diluiti, il che conferma che in condizioni blande di pH (5-8) lo sviluppo di fermentazioni indesiderate risulta favorito.

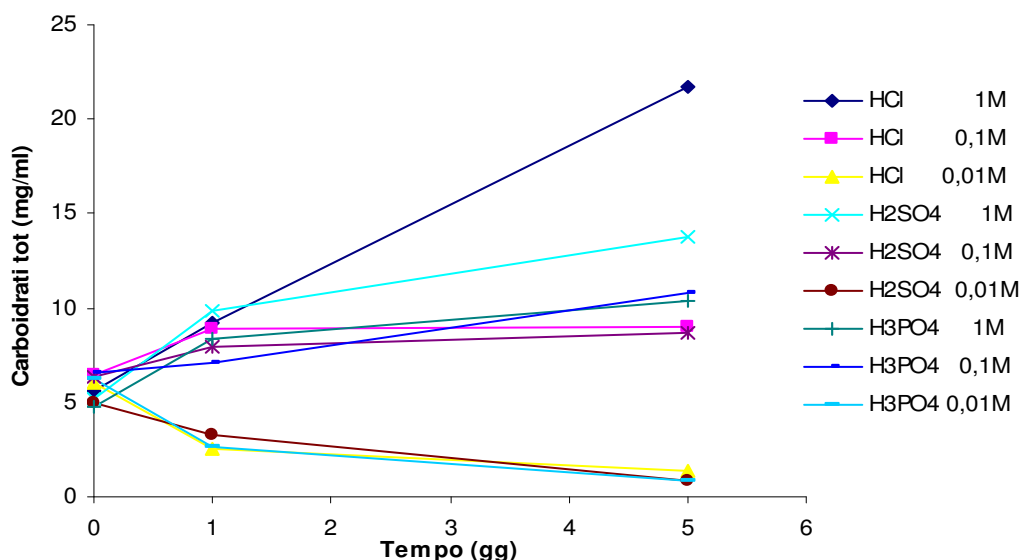


Figura 4.1.: Andamento della concentrazione di carboidrati totali (mg/ml) nei surnatanti dei campioni di estratti di HCl, H₂SO₄, H₃PO₄ 1, 0,1, 0,01M.

4. Risultati e Discussione

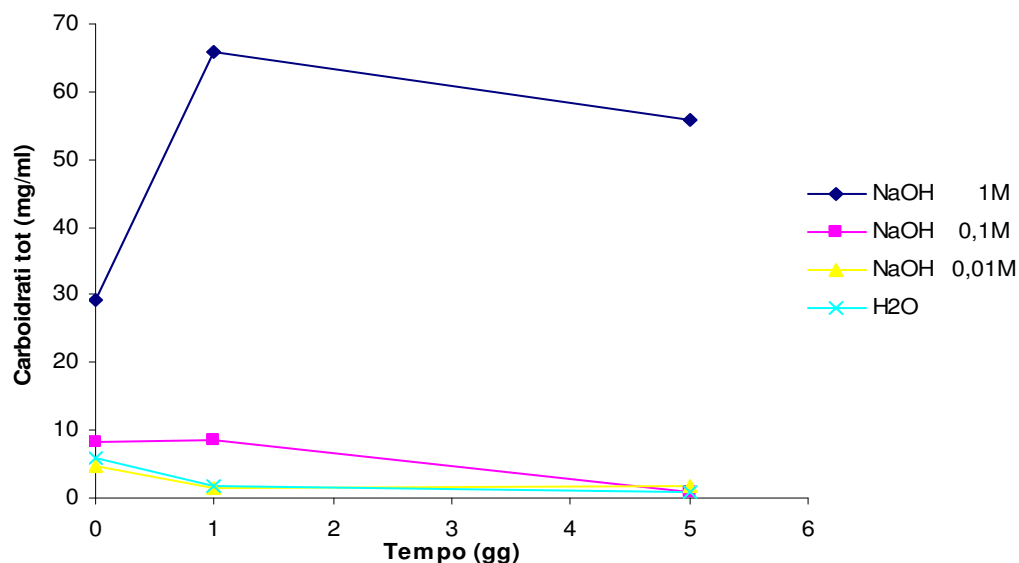


Figura 4.2.: Andamento della concentrazione di carboidrati totali (mg/ml) nei surnatanti dei campioni di estratti di H₂O e NaOH 1 , 0,1 , 0,01M .

Le concentrazioni dei carboidrati totali in 24 ore si attestano su valori di circa 10 mg/ml per tutti i trattamenti acidi. Interessante è l'andamento dei campioni trattati con NaOH 1M in cui si raggiungono concentrazioni di circa 60 mg/ml che sono ben al di sopra di quelle ottenute con i trattamenti acidi. I campioni trattati con soda hanno l'aspetto di un gel che li differenzia da tutti gli altri. Il campione assume un aspetto gelatinoso di colore giallo scuro, è molto omogeneo e la parte solida amalgama nel gel perdendo la consistenza che invece ha negli estratti acidi o neutri.

Oltre alla concentrazione dei carboidrati, che fornisce un indice del grado complessivo di solubilizzazione dei polisaccaridi che i diversi trattamenti riescono a produrre, si è deciso di seguire anche il rilascio in soluzione della frazione pentosanica ovvero delle emicellulose. Tali strutture polisaccaridiche sono quelle che generalmente contengono la frazione fenolica che consente di rinsaldarle formando legami a ponte intr e inter-catena o di ancorarle alle strutture ligniniche. Valutando il rilascio in soluzione della frazione dei pentosani possiamo avere una prima stima indiretta dell'efficienza potenziale del processo idrolitico al fine dei recuperare la frazione fenolica. I valori inerenti alle concentrazioni dei pentosani nei campioni descritti sono riportati in Figure 4.3. e 4.4..

4. Risultati e Discussione

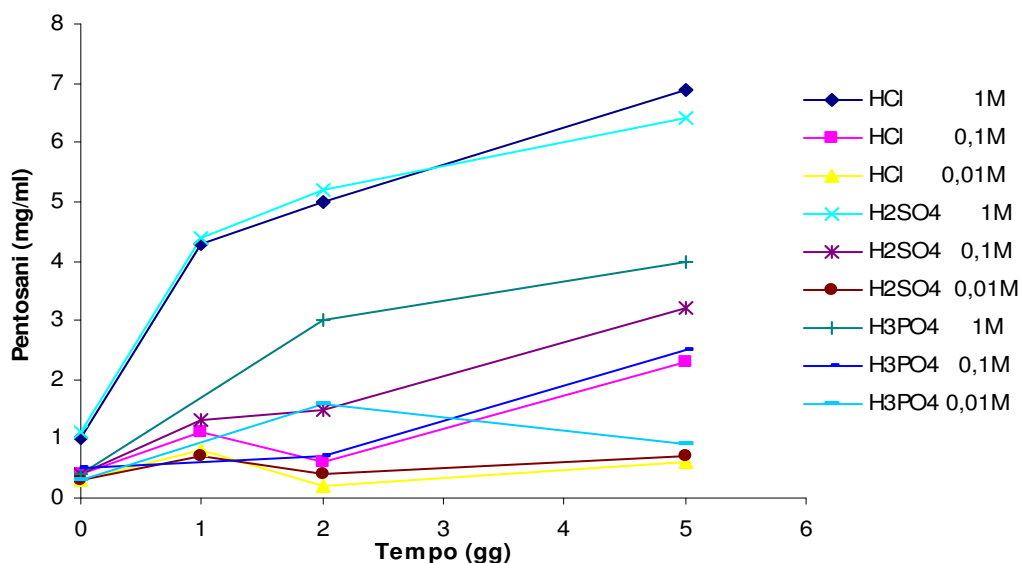


Figura 4.3.: Andamento della concentrazione di pentosani (mg/ml) nei surnatanti dei campioni di estratti di HCl, H2SO4, H3PO4 1, 0,1, 0,01M.

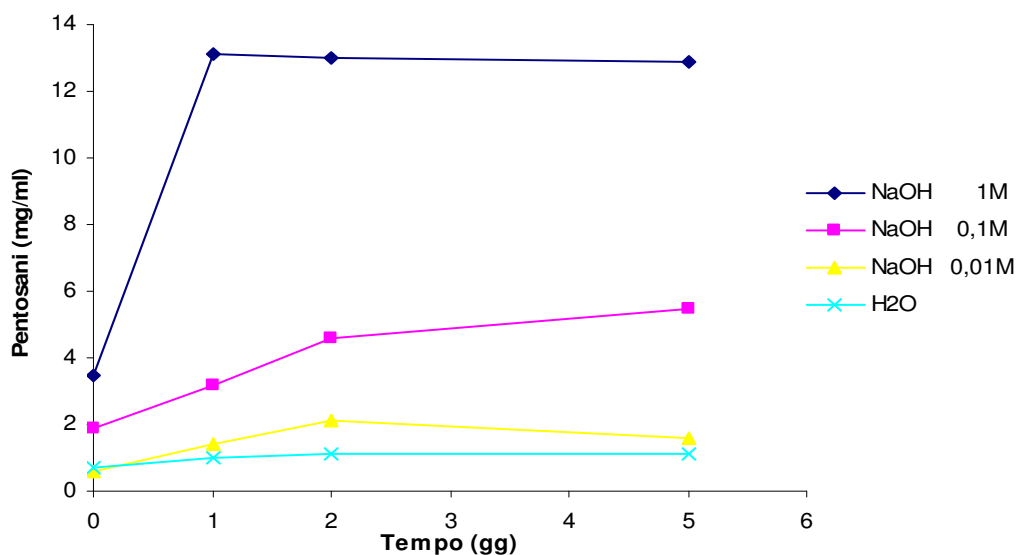


Figura 4.4.: Andamento della concentrazione di pentosani (mg/ml) nei surnatanti dei campioni di estratti di H2O e NaOH 1, 0,1, 0,01M.

Le concentrazioni dei pentosani presentano un andamento simile a quello registrato con i carboidrati totali. Le soluzioni 1 M danno un maggior rilascio in soluzione di pentosani e con NaOH si hanno i valori maggiori rispetto ai campioni trattati con acidi, fino a 13 mg/ml. Le condizioni basiche favoriscono quindi la solubilizzazione della frazione pentosanica in accordo coi dati precedentemente ottenuti da altri autori^{25,63,64}.

Per verificare l'effetto di un pretrattamento termico sul processo di idrolisi della matrice vegetale i trattamenti precedenti sono stati ripetuti trattando i campioni di

4. Risultati e Discussione

crusca come descritto. Oltre ad idrolisi a 30 °C sono state eseguite prove mantenendo i campioni a 85 °C per 1 h ed autoclavandoli (121 °C per 40 minuti). I risultati ottenuti sull'estrazione dei pentosani dagli idrolizzati così preparati sono riportati in Tabella 4.1.. La selettività dell'estrazione dei pentosani rispetto agli zuccheri riducenti è mostrata in Tabella 4.2.. Tale parametro consente di valutare quale sia la frazione di emucellulose solubilizzata durante i trattamenti idrolitici, rispetto al grado complessivo di idrolisi di tutti i polisaccaridi contenuti nella matrice di partenza, stimando quindi la selettività dei trattamenti rispetto alla classe di polisaccaridi più interessante ai fini della solubilizzazione della frazione fenolica. Le temperature più elevate di pretrattamento e il trattamento basico consentono di arricchire l'estratto in pentosani.

Tabella 4.1.: Concentrazione di petosani in idrolizzati di crusca (1:10 in soluzione) alle diverse condizioni di pH (acido e basico) e temperatura (30, 85 e 121°C).

Metodo di idrolisi	Pentosani estratti alle diverse condizioni di temperatura (mg/ml)		
	<i>30°C</i>	<i>85°C</i>	<i>121°C</i>
<i>HCl 1M</i>	1	8,6	2,3
<i>NaOH 1M</i>	13	13	15

Tabella 4.2.: Rapporto petosani / zuccheri riducenti negli idrolizzati di crusca (1:10 in soluzione) alle diverse condizioni di pH (acid e basico) e temperatura (30, 85 e 121°C).

Metodo di idrolisi	Pentosani / z.r. negli estratti alle diverse condizioni di temperatura		
	<i>30°C</i>	<i>85°C</i>	<i>121°C</i>
<i>HCl 1M</i>	0,4	0,2	0,2
<i>NaOH 1M</i>	8,7	13	16

A tutte le temperature, il trattamento basico risulta essere il più efficace nell'arricchire la frazione saccaridica in pentosani. Il campione trattato in

4. Risultati e Discussione

autoclave è, inoltre, quello che ha dato i migliori risultati, probabilmente perché, a temperature superiori a 100 °C, alcune classi di polisaccaridi, come gli amidi, gelificano inglobando acqua, perdendo così la loro struttura compatta e favorendo il processo idrolitico, cosa che a temperature minori avviene in maniera meno marcata. Grazie a tale trattamento è possibile estrarre pentosani sino al 15 % in peso rispetto alla crusca trattata.

Idrolisi enzimatica della crusca di grano

Diversi lavori sperimentali sull'effetto idrolitico di xilanasi²⁵, aril esterasi³³ purificate da diversi microrganismi e combinazioni di tali enzimi²⁸ sono stati effettuati su crusca di grano, scarti della produzione birraria e diverse frazioni (idrosolubili e non idrosolubili) di xilani. Più di recente sono state pubblicati alcuni articoli che si propongono di caratterizzare in maniera più puntuale alcuni preparati enzimatici commerciali con riferimento a specifiche attività e su substrati modello come cellulosa⁶⁵ o xilano⁶⁶. Al meglio delle nostre conoscenze ad oggi la letteratura scientifica ha dedicato meno attenzione all'impiego di tecnologie biocatalitiche per la solubilizzazione della frazione fenolica da scarti dell'agroindustria basate sull'utilizzo di preparati enzimatici commerciali proposti per applicazioni alimentari in processi di biorefining.

Al fine di studiare i parametri sperimentali che regolano un processo biocatalitico di idrolisi delle strutture polisaccaridiche della crusca per ottenere il rilascio in soluzione della componente fenolica covalentemente legata alla parete cellulare vegetale sono state effettuate diverse prove preliminari.

Per le nostre prime prove sono stati utilizzati come biocatalizzatori il cytolase PCL 5 (DSM Italia s.r.l.) e α -amilasi pura da laboratorio Sigma (EC 3.2.1.1. Type XII-A da *Bacillus licheniformis*). Il cytolase PCL5 è un preparato commerciale utilizzato comunemente e già testato e usato nelle esperienze su acque di vegetazione e vinacce presso il nostro laboratorio da cui si sono ottenute buone rese in termini di rilascio di biofenoli da tessuti vegetali. Le attività specifiche ricercate in questo prodotto sono da noi state determinate a pH 6,5 e 30° C sono:

4. Risultati e Discussione

- Attività xilanasica 1500 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- Attività glucosidica 14,7 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- Attività caffeil esterasica 118 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$
- Attività feruloil esterasica 7000 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$

La matrice vegetale del presente studio è di tipo diverso rispetto alle acque di vegetazione e alle vinacce che sono ricche di sostanze pectiche. La crusca è principalmente costituita da cellulosa, amido, arabinosilani e lignina e quindi, data la necessità di idrolizzare strutture polisaccaridiche diverse da quelle studiate sino ad ora, si è deciso di abbinare un'amilasi da laboratorio (Sigma) al Cytolase al fine di ottenere un'idrolisi della rilevante frazione amidacea contenuta nel nostro substrato.

Il trattamento enzimatico è stato eseguito sospendendo la crusca in acqua, determinando un rapporto ottimale acqua crusca in maniera tale da avere un sistema non troppo viscoso e nello stesso tempo impiegando il minor volume d'acqua possibile in modo da minimizzare i costi impiantistici e di lavorazione legati al volume.

Il trattamento enzimatico della crusca è stato effettuato in diversi campioni con rapporti crusca:acqua da 1:3 a 1:13 p/p. In ciascun campione è stato aggiunto l'1% di Cytolase e lo 0,1% di α -amilasi in peso rispetto alla quantità di crusca sospesa in acqua (Tabella 4.3.).

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.3 Concentrazione di zuccheri riducenti, carboidrati totali, pentosani e proteine espressa come grammi estratti da 100 grammi di crusca di frumento iniziale.

Campioni	Z.R. (g/100g di crusca)	Carboidrati totali (g/100g di crusca)	Pentosani (g/100g di crusca)	Proteine (g/100g di crusca)
Valori ottenuti dopo trattamento in autoclave a 121°C per 20 min				
1 : 3	-	-	-	-
1 : 5	1,9	-	0,8	0,6
1 : 7	1,8	-	1,0	0,7
1 : 9	1,1	13,5	1,4	0,7
1 : 11	11	12,5	1,6	0,8
1 : 13	9	14	1,6	0,8
Valori ottenuti dopo 24 ore di trattamento enzimatico				
1 : 3	-	-	-	-
1 : 5	16,8	19,8	8,8	0,5
1 : 7	19,7	28,1	7,3	0,6
1 : 9	18,2	29,7	9,1	0,5
1 : 11	18,5	29,7	9,9	0,5
1 : 13	15,5	28,3	10,4	0,5

Il campione costituito da crusca in acqua nel rapporto 1:3 è pressoché assimilabile a crusca umida e risulta difficoltoso prelevare un'aliquota di estratto liquido soprattutto al tempo 0 dopo autoclave, è stato per ciò impossibile determinare i valori di concentrazione.

Le prove effettuate sui 6 campioni hanno permesso di capire le condizioni operative con cui preparare gli estratti liquidi. Per quanto riguarda l'agitazione della miscela, il rapporto crusca/acqua 1:7 consente di avere una buona miscelazione con l'impiego della minor quantità di acqua. Nelle successive sperimentazioni quindi si utilizzeranno campioni con rapporto acqua e crusca pari a 1:7.

4. Risultati e Discussione

L'aggiunta di acqua deve essere seguita necessariamente da uno step di gelificazione al fine di permettere alle molecole d'acqua di penetrare nella matrice ed operare un'azione di rigonfiamento. Macromolecole quali amido e xilano gelificano inglobando acqua a partire da 50-60°C di temperatura, pertanto si è optato preliminarmente per un pre-trattamento termico in autoclave per favorire il successivo trattamento enzimatico, come già accadeva nei pretrattamenti acido-basici, contribuendo a separare le strutture costituenti la parete cellulare vegetale e a migliorare il successivo ingresso degli enzimi.

Al fine di meglio comprendere quanto e come i trattamenti termici influenzino le strutture vegetali e i successivi trattamenti sino state eseguite prove effettuando pretrattamenti termici a 85°C sulla crusca risospesa in acqua, da confrontare con quelle in autoclave a 121°C, prima di effettuare il trattamento enzimatico. La crusca viene addizionata di acqua in un rapporto 1:7, un campione viene scaldato a 85°C per 20 minuti a bagno maria, l'altro viene messo in autoclave a 121°C sempre per 20 minuti. Per ciascuna temperatura si prepara un campione trattato enzimaticamente con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi.

Il trattamento termico provoca una gelificazione, quindi la soluzione di acqua e crusca diviene molto viscosa come conseguenza del rigonfiamento dei polisaccaridi con l'ingresso di acqua fra le catene polisaccaridiche.

Si lasciano i campioni in agitatore orbitale per 20 ore a 30°C. Trascorse le 20 ore si nota che la sospensione iniziale di acqua e crusca diventa molto più fluida nei campioni trattati enzimaticamente rispetto a quelli non trattati.

L'idrolizzato ottenuto è filtrato su filtro di nylon per separare il solido grossolano sospeso dalla fase liquida. Sui filtrati così ottenuti, opportunamente centrifugati, si valutano gli zuccheri riducenti, i carboidrati totali, i pentosani le proteine e i polifenoli. La tabella 4.4 riassume i risultati delle analisi effettuate dopo il trattamento termico ed enzimatico.

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.4.: Rilascio polisaccaridi in soluzione in seguito ad aggiunta di acqua, trattamenti termici a 85°C e 121°C entrambi per 20 minuti e successivo trattamento enzimatico in entrambi i campioni con 1% v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi

Campioni	Tempo (ore)	Zuccheri Riducenti (mg/ml)	Carboidrati Totali (mg/ml)	PENTOSANI (mg/ml)	PROTEINE (mg/ml)
<i>Crusca+H2O 85°C</i>	0	1,7	6,6	0,3	2,7
<i>Crusca+H2O 121°C</i>		1,6	6,6	0,4	2,6
<i>Dopo trattamento termico 85°C</i>	1	4,2	10,0	1,1	1,3
<i>Dopo trattamento termico 121°C</i>		3,5	12,6	2,7	1,4
<i>Dopo trattamento enzimatico 85°C</i>	20	25,2	46,4	6,0	0,7
<i>Dopo trattamento enzimatico 121°C</i>		34,7	43,9	16,0	0,7

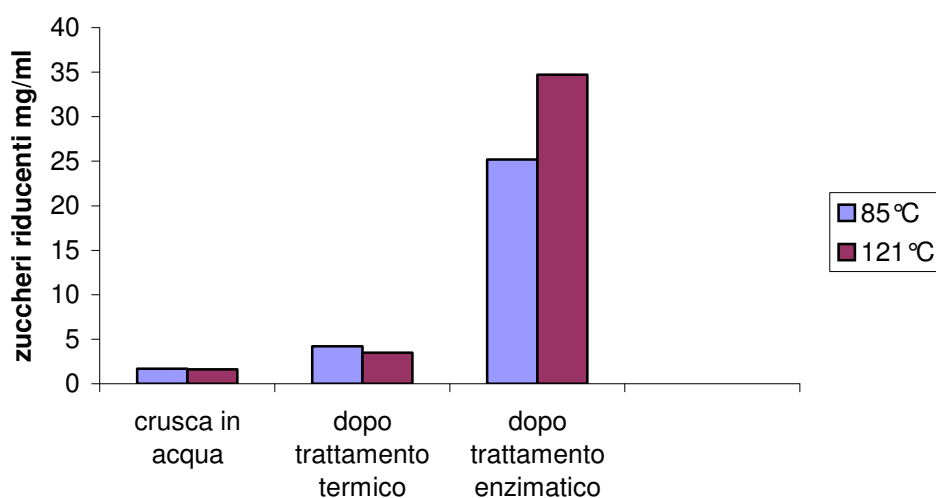


Figura 4.5.: Rilascio degli zuccheri riducenti a vari tempi, dopo l'aggiunta di acqua, dopo il trattamento termico a 85°C e 121°C e dopo il trattamento enzimatico con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi.

4. Risultati e Discussione

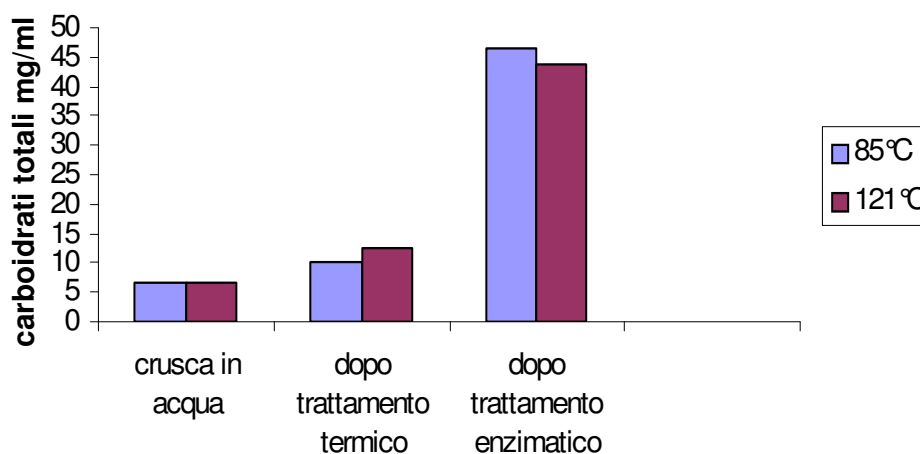


Figura 4.6 Rilascio dei carboidrati totali a vari tempi, dopo l'aggiunta di acqua, dopo il trattamento termico a 85°C e 121°C e dopo il trattamento enzimatico con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi.

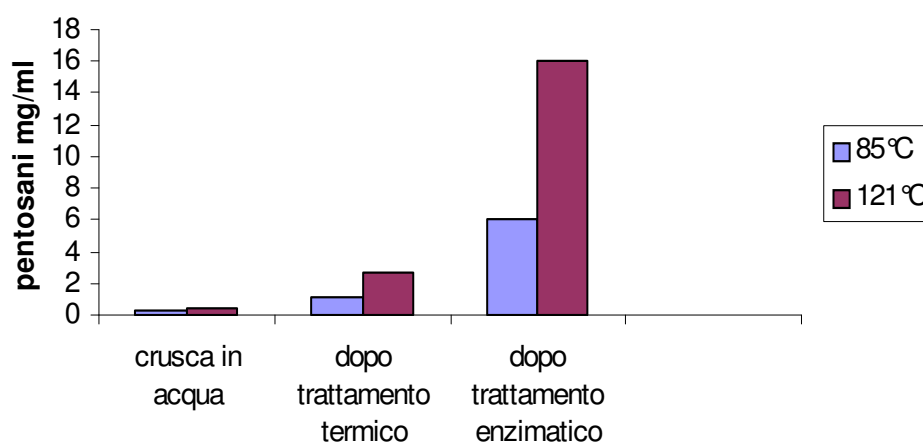


Figura 4.7.: Rilascio dei pentosani a vari tempi, dopo l'aggiunta di acqua, dopo il trattamento termico a 85°C e 121°C e dopo il trattamento enzimatico con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi.

Nella figura 4.5 si nota che, dopo il trattamento termico, il campione trattato a 85°C rilascia più zuccheri riducenti, anche se in misura molto contenuta, rispetto al campione autoclavato. Ciò potrebbe essere dovuto alla presenza di enzimi idrolitici endogeni del frumento che durante il trattamento in autoclave potrebbero essere inattivati. Il trattamento termico favorisce il successivo trattamento enzimatico come riportato da Haki e Rakshit⁶⁷; infatti vengono rilasciate grandi quantità di zuccheri riducenti e di carboidrati totali, le cui concentrazioni aumentano di oltre un ordine di grandezza ed in particolare nelle prove in cui il

4. Risultati e Discussione

pre-trattamento è stato effettuato in autoclave. Tale fenomeno è particolarmente evidente nella frazione pentosanica in cui la gelatinizzazione a 121°C permette un recupero di pentosani di oltre il doppio rispetto a quelli ottenuti a 85°C.

Il trattamento in autoclave inoltre permette di contenere per più tempo le fermentazioni parassite dovute ai microrganismi autoctoni presenti nella crusca durante il trattamento enzimatico. Infatti, trascorse 48 ore, soprattutto sul campione trattato a 85°C si iniziava a sentire un cattivo odore tipico di fermentazioni acidogeniche mentre quello trattato a 121°C risultava ancora piuttosto stabile.

Al fine comprendere meglio come il trattamento enzimatico agisce sul substrato abbiamo seguito il rilascio nel tempo di zuccheri riducenti, carboidrati totali e pentosani.

Sono state preparate due bottiglie pirex contenenti crusca e acqua in rapporto 1:7. I campioni sono stati autoclavati e trattati enzimaticamente analizzandoli ad intervalli di tempo stabiliti dopo averne prelevato e centrifugato un'aliquota.

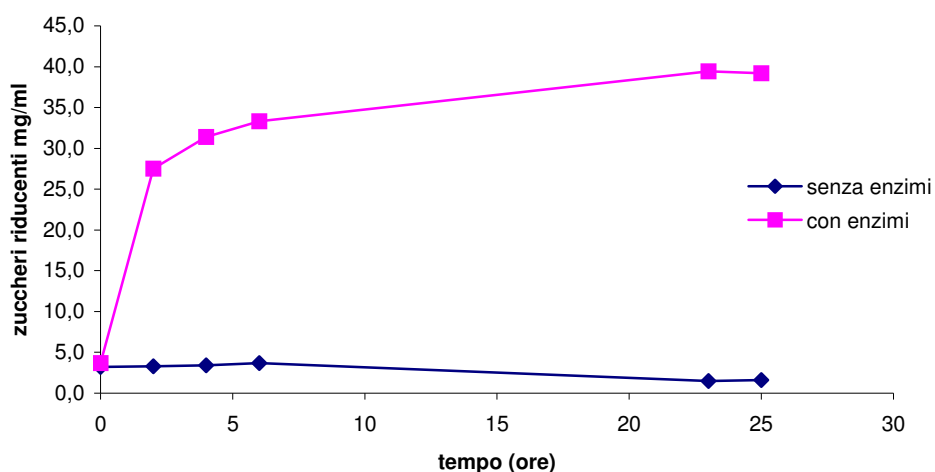


Figura 4.8.: rilascio di zuccheri riducenti in soluzione, in seguito a trattamento con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi, nel tempo

4. Risultati e Discussione

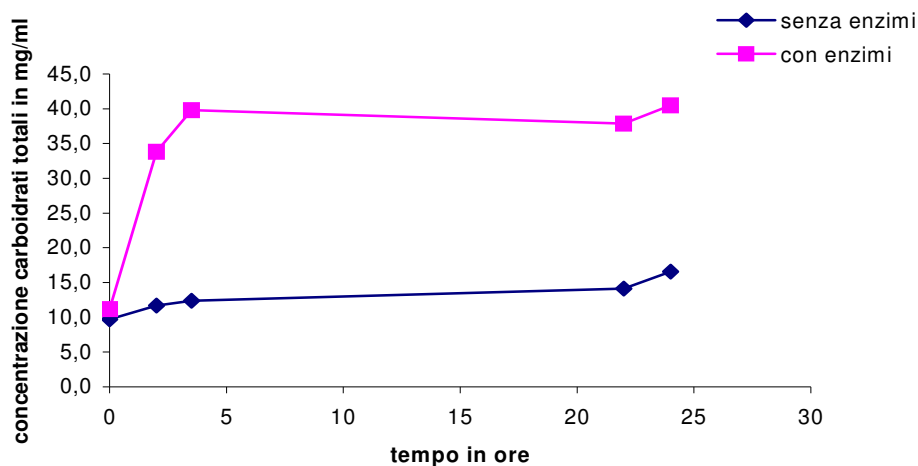


Figura 4.9.: Rilascio di carboidrati totali in soluzione, in seguito a trattamento con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi, nel tempo

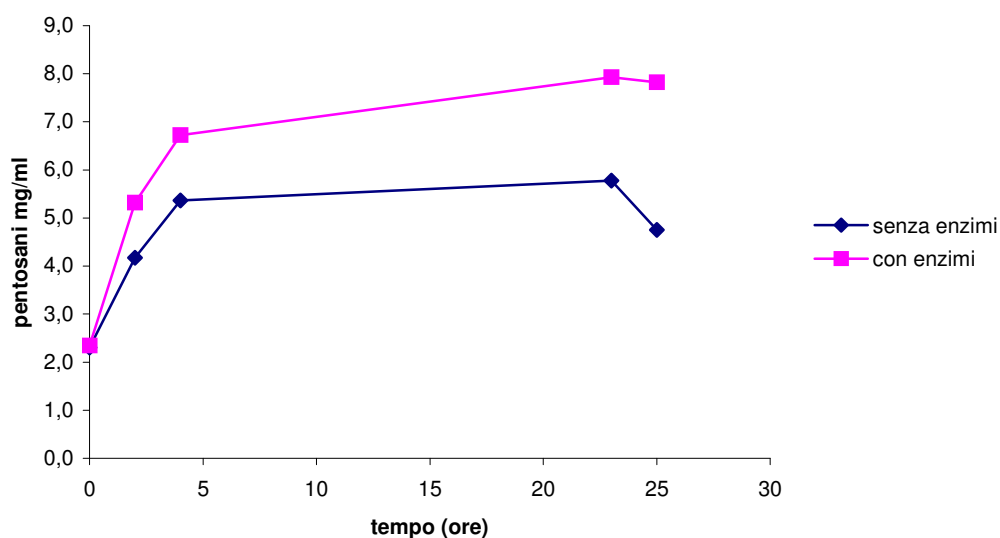


Figura 4.10.: Rilascio di pentosani in soluzione, in seguito a trattamento con 1%v/p Cytolase PCL5 e 0,1% v/p α -amilasi, nel tempo

I carboidrati totali, dopo 4 ore, hanno raggiunto il massimo valore di concentrazione. Per il rilascio di zuccheri riducenti e pentosani è necessario protrarre il trattamento leggermente più a lungo prima di raggiungere il massimo rilascio. Al fine di raggiungere una buona idrolisi del sistema è stato scelto un tempo di 20 ore per il trattamento enzimatico in quanto rappresenta il tipico periodo “overnight” ampiamente utilizzato nelle pratiche di laboratorio.

4. Risultati e Discussione

In presenza di enzima la quantità di zuccheri riducenti rilasciata è piuttosto elevata, circa 35 g/l, di almeno un ordine di grandezza superiore al controllo. Un risultato analogo si è ottenuto con il rilascio dei carboidrati totali nell'ordine di 40 g/l. E' evidente che la maggior parte dei carboidrati totali rilasciati sono assimilabili a zuccheri riducenti il che sta ad indicare un buon processo di saccarificazione degli enzimi ed in particolare dell'amilasi. Per quanto riguarda la frazione dei pentosani non si è osservato lo stesso aumento in presenza dell'enzima, ciò è probabilmente dovuto al fatto che vengono sostanzialmente liberati i pentosani solubili mentre non è stato favorito il rilascio di quelli insolubili.

La quantità di pentosani presenti nella crusca si aggira intorno al 25-40% p/p²⁵, il trattamento enzimatico permette il recupero di circa 70 g/Kg che corrispondono a circa il 20-30% dei pentosani presenti nella crusca. Questa percentuale, considerando la intrinseca variabilità della matrice in oggetto, è consistente con la percentuale dei biofenoli rilasciati durante il trattamento enzimatico (vedi paragrafi seguenti). Ciò conferma che sussiste uno stretto rapporto tra la concentrazione di fenoli rilasciati e quella dei pentosani solubilizzati, a conferma del fatto che la frazione fenolica estraibile è prettamente quella che conferisce stabilità meccanica alle strutture emicellulosiche²⁷ che costituiscono la parete cellulare vegetale.

Verificata preliminarmente l'efficacia di un trattamento enzimatico idrolitico e definiti i principali parametri di lavoro, si è voluto verificare la possibilità di sostituire l'amilasi da laboratorio impiegata nelle prove preliminari, con un preparato enzimatico commerciale al fine di monitorare l'efficienza della procedura di idrolisi con un nuovo processo biocatalitico. E' stato perciò testato, in concomitanza e non con il Cytolase PCL 5, un secondo preparato, il Termamil 120L (Novozyme), venduto come α -amilasi, con un'attività specifica, da noi misurata a pH 6,5 e 25 °C, pari a 45.000 $\mu\text{mol/ml}\cdot\text{min}$. I risultati ottenuti per idrolisi condotte su un substrato pretrattato a diverse temperature e trattato in seguito a 30°C in agitatore orbitale per 2 ore con il preparato amilasico commerciale sono riportati in Tabella 4.5.

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.5.: Rilascio di zuccheri riducenti, carboidrati totali e pentosani da crusche (1:7 in acqua) pretrattate a diverse temperature ed idrolizzate con Termamil 120L 0,01% p/p di crusca a 30 °C in agitatore orbitale per 2 ore.

Temperatura di pretrattamento	z.r. mg/ml	Carb.tot. mg/ml	Pentosani mg/ml
121°C	5	25	2,5
85°C	6	25	1,5
30°C	6	10	0,3

Gli zuccheri riducenti non sembrano essere influenzati dall'aumento della temperatura del pretrattamento. Si nota invece un netto incremento del tenore dei carboidrati totali passando da 30 a 85°C, ma i campioni trattati in autoclave danno risultati analoghi a quelli ottenuti per il campione a 85°C. Per quanto riguarda i pentosani è possibile notare un andamento di idrolisi fortemente incrementato dall'aumentare della temperatura. Questi comportamenti possono nuovamente essere attribuiti all'effetto di disgregazione della struttura polisaccaridica dovuto alla gelificazione dell'amido causata dai pretrattamenti termici ed alla presenza di attività xilanasiche secondarie nel preparato (vedi paragrafi successivi).

E' stato valutato l'effetto di un trattamento combinato dei due enzimi commerciali su substrato pretrattato a diverse temperature. I risultati ottenuti sono riportati in Tabella 4.6.

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.6.: Rilascio di zuccheri riducenti, carboidrati totali e pentosani da crusche (1:7 in acqua) pretrattate a diverse temperature ed idrolizzate con Termamil 120L e Cytolase PCL 5 in peso su peso di crusca trattata.

	Tempo	Enzima	z.r. mg/ml	Carb.tot. mg/ml	Pentosani mg/ml
30°C	2 ore	0,01%p/p Termamil 120L	6	10	0,3
	20 ore	1 % p/p Cytolase® PCL5	8	7	3
85°C	20 ore	0,1% p/p Termamil 120L 0,1% p/p Cytolase® PCL5	18,6	46,4	6
121°C	2 ore	0,1% p/p Termamil 120L 0,1% p/p Cytolase® PCL5	24	58	6
	20 ore	0,1% p/p Termamil 120L 0,1% p/p Cytolase® PCL5	28	54	16
	20 ore	0,1% p/p Termamil 120L 1 % p/p Cytolase® PCL5	40	50	14

Il Cytolase PCL5, preparato contenente diverse attività e dunque in grado di aggredire diverse strutture polisaccaridiche che compongono la parete cellulare vegetale della crusca di grano, sembra agire efficacemente anche da solo sul substrato nonostante siano necessari tempi più lunghi rispetto al Termamil 120L. Anche in queste prove il pretrattamento termico favorisce l'idrolisi di tutte le componenti prese in esame confermando l'importanza dello step di gelificazione delle componenti polisaccaridiche per favorire l'ingresso del biocatalizzatore nelle maglie del tessuto vegetale⁵⁸. L'aumento della concentrazione di biocatalizzatore e del tempo di reazione non influenza le rese di idrolisi in carboidrati totali, ma prolungando da 2 a 20 ore il trattamento si nota un effetto positivo sull'idrolisi dei pentosani. Aumentando le concentrazioni di Cytolase PCL5 è possibile incrementare il tenore degli zuccheri riducenti questo è probabilmente dovuto alla riduzione il peso molecolare medio delle catene polisaccaridiche.

Confrontando i trattamenti idrolitici chimici ed enzimatici è possibile notare come, confrontando i due processi con le performance migliori (NaOH 1 M e 0,1 %p/p Termamil 120L + 1 %p/p Cytolase PCL5) eseguiti a valle di un pretrattamento termico a 121°C, il processo enzimatico consenta di ottenere

4. Risultati e Discussione

estratti con tenore di pentosani analogo a quello ottenuto tramite il consolidato metodo dell'idrolisi basica. Il trattamento enzimatico viene però effettuato su una sospensione di crusca in acqua 1:7 rispetto all'1:10 necessario per effettuare il trattamento basico, ciò consente un risparmio notevole nell'consumo d'acqua di processo con evidenti vantaggi economici in prospettiva di uno scale-up industriale. L'idrolizzato enzimatico risulta inoltre più fluido e consente un più efficiente allontanamento del solido durante il processo di separazione, altro punto che favorisce il trattamento biocatalitico rispetto a quello basico.

Contenuto in biofenoli degli idrolizzati di crusca: prove preliminari

Gli idrolizzati di crusca, preparati come descritto, sono stati analizzati anche per il loro contenuto di biofenoli e per il loro potere antiossidante. Il contenuto in biofenoli della crusca dopo idrolisi basica del campione è di 6,1 g/kg di crusca trattata di questi 4,6 g sono acido ferulico. Tali dati sono consistenti con quelli riportati da Faulds e coautori per della crusca di grano completamente priva di residui amidacei (acido ferulico 5,4 g/Kg, acido p-cumarico 0,16 g/Kg, diferulati 0,9 g/Kg). Negli idrolizzati enzimatici da noi preliminarmente ottenuti è stato determinato un contenuto di fenoli totali di 0,44 g/L, ovvero è possibile recuperare fino a 3,1 g di biofenoli per Kg di crusca trattata pari a circa il 50% del contenuto totale.

E' stato determinato il potere antiossidante degli idrolizzati da noi ottenuti ed è stato osservato come tale parametro non vari linearmente con la concentrazione di biofenoli (Tabella 4.7.). Tale risultato è consistente con i comportamenti tipici delle miscele di antiossidanti che riescono a generare cascate elettroniche complesse^{68,69,70}.

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.7.: Concentrazioni di biofenoli e potere antiossidante degli idrolizzati chimici ed enzimatici di crusca.

Campioni	Fenoli totali nell'estratto liquido (mg/L)	Fenoli estratti per Kg di crusca (mg/Kg)	Potere antiossidante ORAC/L[†]
Controllo	223	2200	6,8
Idrolizzato Chimico (1:10)	614	6100	228
Controllo	267	1800	22,9
Idrolizzato Enzimatico (1:7)	440	3100	245

[†] Oxygen Radical Absorbance Capacity: risultati riportati come μmol di Trolox[®]Equivalenti litro di idrolizzato (TE/L).

4.2. Studio di biocatalizzatori commerciali per l'idrolisi enzimatica della crusca

Caratterizzazione dei preparati enzimatici commerciali

Da diversi anni sono presenti sul mercato molti preparati enzimatici commerciali per gli usi più disparati: favorire la lievitazione dei prodotti da forno⁷¹, facilitare le operazioni di filtrazione o chiarificazione di succhi di frutta⁵⁷, migliorare l'estrazione di pigmenti durante la fase di macerazione di mosti per vinificazione in rosso⁷² etc. Questi preparati vengono proposti dalle case produttrici come additivi tecnologici ad uso specifico e non come preparati enzimatici caratterizzati puntualmente per le loro attività. Essi infatti vengono ottenuti per via fermentativa da ceppi microbici o fungini, selezionati per sovrapprodurre determinate classi enzimatiche ma la reale composizione del panel di attività presenti nel prodotto finito, o non viene caratterizzato, o viene trattato come dato sensibile e quindi non divulgato dal produttore. Trattandosi di prodotti commerciali ci si imbatte poi in un'ulteriore problematica, quella dell'innovazione di prodotto. Con cadenza quasi annuale infatti, i prodotti proposti dalla stessa casa cambiano nome commerciale e a volte anche caratteristiche peculiari. Emblematico il caso del Cytolase 0, preparato enzimatico proposto dalla DSM come pectinasi ad ampio spettro, utilizzato per la prima volta nei nostri laboratori 6 anni fa, divenuto dopo un anno Cytolase PCL5 e due anni fa Cytolase M102.

Volendo utilizzare questi preparati come biocatalizzatori a basso costo, ma in maniera razionale al fine di indirizzare il processo nella direzione desiderata, è dunque necessario provvedere ad una caratterizzazione puntuale delle attività enzimatiche di maggior interesse curandosi relativamente delle indicazioni fornite dal produttore.

Al fine quindi di procedere ad una scelta razionale dei biocatalizzatori da utilizzare in un processo di bioraffinazione tramite idrolisi enzimatica della crusca, per di ottenere estratti arricchiti in acido ferulico, è necessario procedere


4. Risultati e Discussione

alla caratterizzazione di alcuni preparati enzimatici scelti tra quelli proposti per substrati simili a quelli oggetto delle nostre ricerche.

Al fine di poter fare delle considerazioni ponderate sull'efficienza di idrolisi dei diversi biocatalizzatori finalizzata al processo di solubilizzazione della frazione fenolica contenuta nella crusca, la caratterizzazione non deve necessariamente essere specifica in termini di identificazioni delle diverse classi e famiglie di carboidrasi o esterasi né in termini di differenti oligo e polisaccaridi rilasciati. In letteratura sono ampiamente diffusi lavori che si occupano specificamente della caratterizzazione delle diverse classi di enzimi estratti da diversi microrganismi, diversificati anche in base alle affinità per specifici substrati, tipologia di prodotti di reazione e possibili inibizioni o azioni sinergiche^{16, 17, 18, 20, 22}.

Per valutare un preparato enzimatico ai fini di un suo impiego come biocatalizzatore industriale per ottenere una solubilizzazione della frazione fenolica contenuta nella crusca di grano è più funzionale una caratterizzazione che preveda la determinazione delle principali attività carboidrasiche al fine di poter idrolizzare tutte le principali strutture polisaccaridiche dei vegetali, ed alcune specifiche attività esterasiche per poter valutare la capacità del biocatalizzatore di scindere gli specifici legami tra fenoli e polisaccaridi. Per quanto riguarda la modalità di determinazione delle attività enzimatiche carboidrasiche, risulta per ciò più funzionale un saggio che renda conto del numero complessivo di legami scissi che non la determinazione puntuale della tipologia di oligosaccaridi liberati. Per questo motivo si è deciso di procedere alla determinazione delle attività carboidrasiche totali dei diversi preparati utilizzando un saggio, quello degli zuccheri riducenti, che consente di valutare su substrati modello (cellulosa, xilano, pectina e amido), l'azione complessiva di tutte le diverse attività enzimatiche contenute nei preparati commerciali.

Preparati enzimatici scelti, con relative attività dichiarate dal produttore, sono:

-  Cytolase M102 (erede commerciale di Cytolase PCL5, DSM): preparato enzimatico liquido di colore marrone scuro commercializzato come **pectinasi**;

4. Risultati e Discussione

- Termamil 120L (Novozyme): preparato enzimatico termoresistente liquido di colore giallo che opera idrolizzando i **legami α -1,4 in polisaccaridi costituiti da tre o più unità di glucosio** legate α -1,4. I legami α -1,6 non vengono idrolizzati;
- Celluclast BG (Novozyme): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro proposto come **cellulasi**;
- Fungamyl Super AX (Novozyme): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro, miscela **di α -amilasi e di pentosanasi**;
- Pentopan 500 BG (Novozyme): preparato enzimatico granulare di colore marrone chiaro, proposto come **1,4-endoxilanas**.

I primi due preparati sono quelli utilizzati per le sperimentazioni, salvo gli eventuali cambiamenti dovuti all'innovazione di prodotto di cui si è detto. Gli altri tre preparati scelti sono stati selezionati tra l'ampia gamma di prodotti disponibili per preparazioni da forno come aditivi per migliorare la lievitazione o le caratteristiche meccaniche del prodotto finito.

Sono state eseguite prove di laboratorio, al fine di valutare le capacità idrolitiche dei diversi preparati e le loro attività specifiche per il rilascio della frazione fenolica dalle strutture della parete cellulare vegetale alla quale sono generalmente legate in maniera covalente.

Le attività pectinasica, amilasica e xilanasica, sono state determinate per via spettrofotometrica dosando la concentrazione di zuccheri riducenti rilasciati con il metodo dell'ADNS utilizzando come substrati specifici delle soluzioni all'1% p/v di pectina, α -amilosio e xilano, rispettivamente.

L'attività cellulasica è stata anch'essa seguita con il metodo dell'ADSN immergendo un rettangolo di cellulosa (carta da filtro) di 1 g in 10 ml di soluzione enzimatica. Questo tipo di misurazione ha molti limiti, legati essenzialmente al metodo utilizzato, in quanto la cellulosa è un polimero generalmente insolubile in acqua. Alla misura di attività è stata per ciò associata una valutazione visiva del tipo e del grado di disgregazione che il substrato subiva a valle di 20 ore di

4. Risultati e Discussione

trattamento come suggerito da Wood e Bahat 1988⁷³ per una valutazione complessiva dell'effetto idrolitico del preparato enzimatico.

L'attività glucosidasica, ovvero la capacità dell'enzima di riconoscere specificamente il glucosio e idrolizzare un legame β -1,4-glucosidico, è stata determinata spettrofotometricamente utilizzando come substrato l'orto-nitrofenil β -D glucopiranoside.

Le attività feruloil e caffeil esterasiche (arilesterasiche), ovvero la capacità del preparato enzimatico di riconoscere selettivamente il composto fenolico e di idrolizzare il legame covalente che questo instaura con il saccaride della parete cellulare al quale è legato, sono state determinate per via spettrofotometrica misurando il calo di assorbanza di una soluzione metil-ferulato e caffeil-ferulato rispettivamente, a 335 nm, lunghezza d'onda alla quale la differenza di assorbimento tra estere e rispettivo fenolo libero è maggiore.

E' stata inoltre valutata la presenza di possibili attività laccasiche nei diversi preparati, già per altro riscontrate in precedenza nel Cytolase 0 presso il nostro laboratorio, utilizzando il metodo dell'accoppiamento ossidativo tra guaiacolo e MBTH. Essendo gli estratti enzimatici commerciali generalmente ottenuti da funghi^{14,57,58,59,61}, è lecito ipotizzare la presenza di attività fenolossidasiche, caratteristiche di questi organismi. Tali attività potrebbero limitare le rese del processo estrattivo della componente fenolica da crusca ossidando i fenoli una volta che questi vengono resi solubili, e devono quindi essere escluse.

I risultati ottenuti dallo screening delle attività enzimatiche dei preparati commerciali testati, determinate a pH 6.5 e 30 °C, sono riassunti in Tabella 4.8.

Osservando le attività enzimatiche determinate per il Cytolase M102 si nota come questo preparato, venduto come pectinasi, mostra sì una buona attività di questo tipo, ma la sua principale attività è in realtà quella xilanasica. Hang e Woodams avevano già evidenziato come molti preparati enzimatici commerciali venduti per l'industria dei succhi di frutta possedessero in realtà anche elevate attività xilanasiche. Tra i preparati esaminati dai due autori figuravano anche il Cytolase PCL5 e il Cytolase M102 per i quali sono riportate attività di 1070 e 580 in $\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ a pH 5,6 e 37 °C. Le differenze coi dati da noi ottenuti possono in parte essere attribuiti alle diverse condizioni di pH e temperatura

4. Risultati e Discussione

durante le analisi, riteniamo però che gli autori abbiano protratto il periodo di incubazione dell'enzima sul substrato troppo a lungo (10 min). Durante la messa a punto del metodo di misura dell'attività xilanasica abbiamo infatti notato che prolungando i tempi di incubazione la concentrazione di zuccheri riducenti in soluzione non risultava aumentare in maniera lineare per tempi superiori a 5 minuti. Tale comportamento, osservato per tutti i preparati anche per le attività pectinasica e amilasica, è probabilmente dovuto a processi di inibizione da prodotto che generalmente accomunano gran parte delle carboidrasi. Con l'accumulo nell'ambiente di reazione di oligosaccaridi a basso peso molecolare col tempo le problematiche di inibizione diventano più rilevanti per ciò riteniamo che gli autori abbiano in realtà ottenuto dati che sottostimano la reale attività dei preparati che hanno esaminato. Cytolase M102 mostra inoltre elevate attività amilasiche e cellulosiche discrete attività glucosidasiche e esterasiche, anche se abbiamo riscontrato una drastica riduzione dell'attività feruloil esterasica. fondamentali per la solubilizzazione della componente fenolica. Il preparato possiede tutte le attività necessarie per idrolizzare le strutture vegetali della crusca e rilasciare la componente fenolica in soluzione come il suo predecessore Cytolase PCL5.

Il Celluclast BG, venduto come cellulasi, nonostante la bassa attività cellulosica determinata col metodo spettrofotometrico, mostra in realtà la capacità di discogliere completamente la struttura cellulosica in appena 2 ore. Ciò è presumibilmente dovuto ad una bassa attività eso-cellulasica, in grado di liberare in breve tempo un'elevata quantità di monomeri terminali della catena polisaccaridica, correlata però ad una elevatissima attività endo-cellulasica, in grado di destrutturare velocemente la matrice fibrosa liquefacendola (il Termamil 120L presenta caratteristiche esattamente opposte). A queste caratteristiche il Celluclast BG associa buone attività pectinasiche e xilanasiche, ma nessuna attività esterasica. Per tali motivi questo preparato risulta essere un ottimo biocatalizzatore al fine di destrutturare le microfibrille di cellulosca che rappresentano l' "ossatura" di quasi tutte le pareti cellulari vegetali, ma presenta evidenti limiti per quanto riguarda la possibilità di solubilizzare la componente fenolica in essa contenuta.

4. Risultati e Discussione

Fungamil Super AX e Pentopan 500 BG mostrano elevatissime attività feruloil e caffeil esterasiche e buone attività glicosidasiche, e si propongono quindi potenzialmente come migliori biocatalizzatori al fine di effettuare un recupero di biofenoli da questo tipo di matrice. Il Fungamil Super AX mostra inoltre un'attività amilasica, per la quale viene commercializzato, 30 volte maggiore rispetto al Pentopan 500 BG, venduto come xilanasi, ma che ha invece il suo punto di forza nell'attività pectinasica, per la quale risulta anche migliore di preparati appositamente commercializzati (Cytolase M102).

4. Risultati e Discussione

Tabella 4.8.: Riassunto delle attività enzimatiche determinate a pH 6,5 e 30°C (esprese in μmol (di substrato caratteristico rilasciato) $\cdot \text{mg}^{-1}$ (ml^{-1} Cytolase M102 e Termamil 120L) $\cdot \text{min}^{-1}$) nei diversi preparati commerciali analizzati. In rosso sono evidenziate le attività per le quali il preparato è commercializzato

ATTIVITA'*	Pectinasica	Xilanasica	Amilasica	Glucosidasica	Cellulasica	Feruloil Esterasica	Caffeil Esterasica	Laccasica
ENZIMA								
Cytolase M102	10709	1584	1031	5,77	18,50 il pezzetto di cellulosa utilizzato come substrato viene "sciolto" in circa 20 ore	237	127	0
Termamil	1711	140	45429	0	78,57 il pezzetto di cellulosa utilizzato come substrato viene smantellato in circa 20 ore; nella soluzione sono presenti fibre lunghe di cellulosa	0	0	0
Celluclast BG	6899	2238	943	3,46	0,71 il pezzetto di cellulosa utilizzato come substrato viene "sciolto" in 2 ore; nella soluzione sono presenti residui di cellulosa	0	0	0
Fungamil Super AX	10515	1808	33001	5,34	0,39 il pezzetto di cellulosa utilizzato come substrato dopo 20 ore viene solamente spezzato in residui di cellulosa grossolani	8064	15615	0
Pentopan 500 BG	15635	2174	1031	6,72	0,06 il pezzetto di cellulosa utilizzato come substrato dopo 20 ore viene disgregato lasciando alcuni residui di cellulosa	20340	27692	0

Efficacia dei biocatalizzatori nel rilascio di acido ferulico da crusca

Al fine di valutare la reale efficacia dei preparati enzimatici in esame nel rilasciare acido ferulico da crusca sono state effettuate delle prove di idrolisi. La crusca è stata sospesa in acqua (1:7), trattata termicamente a 121°C per 21 minuti in autoclave e, una volta riportato il campione a temperatura ambiente, è stato aggiunto l'1% p/p di crusca dei diversi biocatalizzatori. I campioni così preparati sono stati incubati in agitatore orbitale termostato a 30°C. Aliquote dell'idrolizzato sono state prelevate dopo 5 e 20 ore di trattamento e centrifugate per allontanare i residui solidi. I campioni così ottenuti sono stati analizzati per determinare il contenuto in acido ferulico tramite HPLC. I dati ottenuti sono riportati in figura 4.11. ed espressi come mg di acido ferulico rilasciato per Kg di crusca trattata ipotizzando un completo recupero dell'acqua di trattamento aggiunta per ottenere la sospensione iniziale.

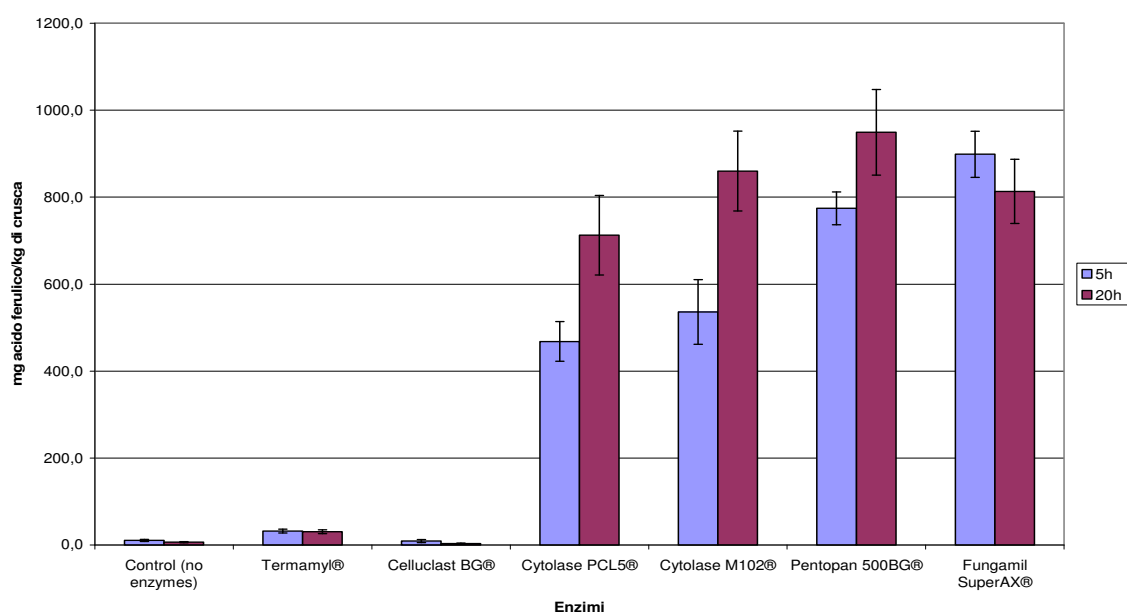


Figura 4.11.: Rilascio di acido ferulico da crusca (in acqua 1:7) pretattata termicamente a 121°C utilizzando diversi biocatalizzatori enzimatici

Come atteso Termamyl 120L e Celluclast BG non riescono ad espletare alcuna azione di rilascio di acido ferulico dalla matrice vegetale in quanto completamente

4. Risultati e Discussione

privi delle necessarie attività arilesterasiche. Tali preparati, agendo però sulle strutture cellulosiche della parete cellulare vegetale, consentono di ottenere, nel caso del Celluclast BG già dopo poche ore di trattamento, delle sospensioni molto fluide e quindi un buon recupero di acqua dal sistema, che dopo il pretrattamento termico risulta strettamente coordinata nei gel che i polisaccaridi formano a caldo.

Le due versioni del Cytolase mostrano un andamento pressoché identico, ovvero dopo 5 ore di trattamento si può già notare un discreto rilascio di acido ferulico dalla matrice vegetale, valore che incrementa prolungando il tempo di contatto coi biocatalizzatori a 20 ore. La spiccata differenza riscontrata nell'attività feruloil esterasica dei due Cytolase non sembra essere determinante ai fini del rilascio di tale molecola dalla matrice reale.

Il Pentopan 500 BG mostra un andamento simile, ma risulta essere più efficiente già nelle prime ore di trattamento. Tale comportamento è presumibilmente attribuibile alle più elevate attività arilesterasiche di questo preparato rispetto ai precedenti (1-2 ordini di grandezza superiori).

Il Fungamil Super AX ha mostrato le migliori *performances* rispetto agli altri biocatalizzatori testati. Già in 5 ore di trattamento questo preparato riesce ad espletare completamente la sua azione di rilascio nonostante attività arilesterasiche inferiori rispetto al Pentopan 500BG. Tale osservazione lascia supporre che un'elevata attività amilasica, principale differenza tra i due prodotti, favorisca in maniera indiretta il rilascio di acido ferulico destrutturando componenti specifiche dalla parete cellulare vegetali consentendo una più rapida azione delle arilesterasi.

Utilizzo simultaneo di diversi preparati enzimatici commerciali

Per valutare in maniera più approfondita l'effetto delle diverse attività enzimatiche dei biocatalizzatori in esame sul processo idrolitico, sono state eseguite delle prove di rilascio dell'acido ferulico utilizzando più preparati simultaneamente.

4. Risultati e Discussione

Le prove sono state effettuate come precedentemente descritto utilizzando ogni biocatalizzatore all'1 % p/p di crusca. I dati ottenuti sono riportati in Figura 4.12. ed espressi come mg di acido ferulico rilasciato per Kg di crusca trattata ipotizzando un completo recupero dell'acqua di trattamento aggiunta per ottenere la sospensione iniziale.

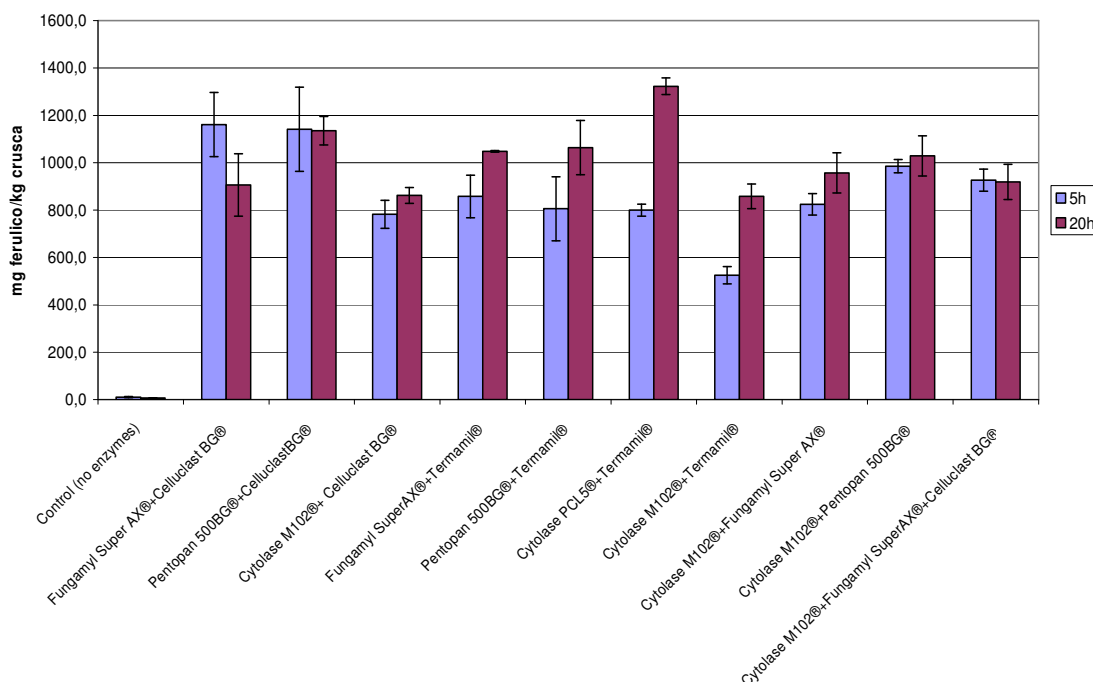


Figura 4.12.: Rilascio di acido ferulico da crusca (in acqua 1:7) pretattata termicamente a 121°C utilizzando diverse miscele di biocatalizzatori enzimatici

L'utilizzo simultaneo di più preparati enzimatici aventi attività arilesterasiche, Cytolase M102 + Fungamyl Super AX, Cytolase M 102 + Pentopan 500 BG, Cytolase M 102 + Fungamyl Super AX + Celluclast BG, ha portato a leggeri incrementi delle rese di rilascio di acido ferulico in soluzione. L'effetto più evidente dell'utilizzo di più biocatalizzatori, è la diminuzione del tempo di contatto necessario per raggiungere il massimo di resa di rilascio. Tale effetto può essere attribuito alla maggiore concentrazione di biocatalizzatore.

L'utilizzo simultaneo di biocatalizzatori capaci di rilasciare acido ferulico con Termamil 120L, preparato di per sé inefficace nei confronti degli esteri ferulici, ma dotato di elevatissima attività amilasica, ha mostrato risultati differenti. L'impiego di Cytolase M102 e Termamil 120L non ha causato cambiamenti rispetto al solo utilizzo del primo preparato. Utilizzando invece Cytolase PCL5 e

4. Risultati e Discussione

Termamil 120L si può notare come le rese di rilascio di acido ferulico incrementino notevolmente. Il PCL5 è risultato leggermente meno efficiente dell'M102 quando i preparati sono utilizzati singolarmente ma il loro comportamento cambia radicalmente quando i due preparati sono utilizzati assieme al Termamil 120L. Ciò può essere dovuto a effetti sinergici tra l'attività amilasica di Termamil 120L e altre attività presenti in PCL5 ma assenti in M 102 e da noi non monitorate in maniera specifica. I due preparati dunque, sebbene siano l'uno l'erede commerciale dell'altro, differiscono sensibilmente nella composizione e non semplicemente come denominazione.

L'utilizzo simultaneo di Pentopan 500BG e Termamil 120L porta ad un leggero incremento complessivo della resa di rilascio. Utilizzando simultaneamente Fungamil Super AX e Termamil 120L si ottiene un incremento del rilascio, anche sensibile, ma solo dopo 20 ore di trattamento.

Il Celluclast BG, sia durante le prove di caratterizzazione del preparato che durante i test sulla crusca ha sempre mostrato una spiccatissima capacità destrutturante consentendo di ottenere, già in pochi minuti di trattamento, delle masse molto più fluide rispetto a tutti gli altri preparati in esame. L'utilizzo di questo prodotto in concomitanza con i biocatalizzatori in grado di rilasciare l'acido ferulico, consente di incrementare notevolmente le rese complessive di processo permettendo di recuperare maggiori quantità di idrolizzato liquido dalla sospensione di crusca che, dopo il pretrattamento termico e la conseguente gelificazione della diverse frazioni polisaccaridiche, tende ad inglobare molta dell'acqua aggiunta.

L'utilizzo simultaneo di Celluclast BG e Cytolase M 102 consente di raggiungere le stesse rese di rilascio che con il solo M 102 si ottenevano in 20 ore, già dopo 5 ore di trattamento. La destrutturazione della matrice consente al biocatalizzatore di esplicare più rapidamente la sua funzione.

Accoppiando Celluclast BG e Pentopan 500 BG si ottiene, oltre all'effetto di accorciamento dei tempi di contatto necessari, anche un leggero incremento delle rese di rilascio.

Utilizzando simultaneamente Fungamil Super AX e Celluclast BG si ha un notevole incremento delle rese di rilascio nelle 5 ore. Questa coppia di

4. Risultati e Discussione

biocatalizzatori ha mostrato un'elevata efficienza nel destrutturare le pareti cellulari vegetali rilasciando gran parte dell'acqua di coordinazione che i polisaccaridi inglobano durante la gelificazione che avviene a causa del pretrattamento termico e consente un più efficace recupero della componente fenolica solubilizzata

Per approfondire la comprensione del meccanismo di idrolisi della matrice e il rilascio dell'acido ferulico da essa, sono state effettuate ulteriori prove monitorando nel tempo ad intervalli ridotti la concentrazione di ferulico rilasciato utilizzando come biocatalizzatori Fungamil Super AX e Celluclast BG simultaneamente. I dati ottenuti sono riportati in Figura 4.13..

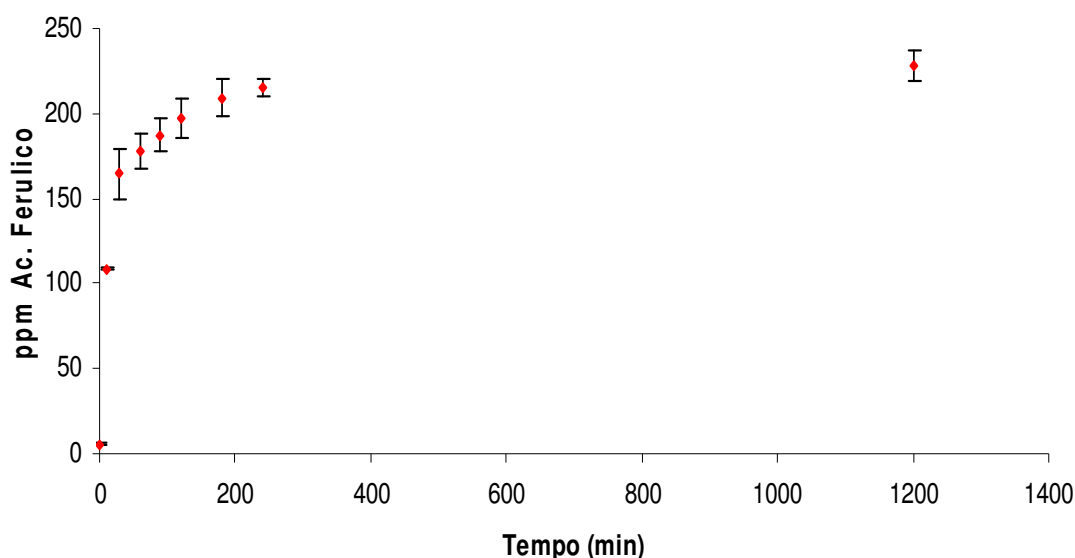


Figura 4.12.: Rilascio di acido ferulico da crusca (in acqua 1:7) pretattata termicamente a 121°C utilizzando Fungamil Super AX e Celluclast BG simultaneamente

La coppia di biocatalizzatori utilizzata agisce molto rapidamente, in un ora di trattamento si raggiunge già quasi l'80% di resa, in tre ore oltre il 90%. La possibilità di ridurre i tempi di trattamento biocatalitico, dopo un attenta valutazione delle rese di recupero assolute, legate strettamente alla quantità di idrolizzato effettivamente recuperato, potrà consentire di ridurre i costi di un eventuale processo industriale e di limitare fortemente la possibilità di instaurarsi di processi fermentativi, che compromettono la possibilità di recuperare l'acido

4. Risultati e Discussione

ferulico, rispetto ai quali il presente processo si è mostrato suscettibile data l'estrema fermentescibilità dell'idrolizzato.

Gli effetti sinergici tra attività xilanasiche e feruloil esterasiche era già stato dimostrato in precedenti ricerche. In particolare in Faulds e coautori (2003) abbiamo dimostrato che le diverse famiglie di feruloil esterasi sono in grado di rilasciare, in 3 ore di trattamento a pH 6 e 37 °C, acido ferulico in maniera efficiente dalla frazione solubile di arabinoxilani (50-80%) ma in maniera assai più scarsa dalla frazione insolubile (4-6%). L'utilizzo simultaneo di xilanasi, purificate da diverse specie microbiche, consente di raggiungere rese di estrazione del 100% per la frazione solubile e del 53% per la frazione insolubile di arabinoxilani. Su substrati più complessi come crusca di grano o scarti della produzione birraria tutte le feruloil esterasi risultano inefficaci per rilasciare il ferulico dalla matrice. Aggiungendo le diverse xilanasi si ottengono rese di rilascio in ferulico molto variabili (1-53%) con valori che si aggirano mediamente attorno al 20%.

I trattamenti biocatalitici da noi messi a punto consentono di ottenere idrolizzati di crusca con un tenore di acido ferulico libero compreso tra 140 e 210 mg/L con le combinazioni di biocatalizzatori più efficienti. Ipotizzando un recupero pressoché completo del liquido aggiunto durante operazioni di separazione del residuo solido è perciò possibile stimare la solubilizzazione di 0,98-1,47 g di acido ferulico per Kg di crusca trattata. Essendo il contenuto di acido ferulico estraibile dalla crusca in esame tramite idrolisi basica di 4,60 g/Kg le rese di rilascio dei processi da noi studiati si aggirano tra il 20 e il 30%. Tali rese, in assoluto non elevatissime, sono invece estremamente incoraggianti se confortanti poiché in linea con quelle ottenute grazie all'utilizzo di enzimi purificati e nelle condizioni estremamente controllate delle prove di laboratorio precedentemente riportate.

Bilanci di materia preliminari del processo di idrolisi enzimatica della crusca

Per valutare l'efficienza del processo di idrolisi enzimatica della crusca di grano dal punto di vista del recupero di materia da un sottoprodotto, tramite solubilizzazione in ambiente acquoso delle frazioni ulteriormente valorizzabili, sono stati effettuati dei bilanci di massa preliminari.

100 g di crusca sono risospesi in 700 ml di acqua e il tutto è sottoposto a pretrattamento termico in autoclave e ad idrolisi enzimatica con Fungamil Super AX e Celluclast BG (1 g ciascuno) per 20 ore. Dopo il trattamento idrolitico il solido viene separato tramite filtrazione. La frazione solida non idrolizzata viene lavato con acqua e posto in stufa a 75°C per la determinazione del peso secco. Aliquote di 1,00 ml di filtrato vengono poste in eppendorf e poste anch'esse in stufa a 75°C per la determinazione del peso secco dell'idrolizzato.

La frazione di crusca non idrolizzata dai processi biocatalitici ha un contenuto di umidità del 300%. Il secco derivante dal trattamento di 100 g di crusca è di 33,3g. Considerando che la crusca ha un tenore di umidità circa del 10% la frazione non idrolizzabile tramite trattamenti biocatalitici è il 37% del peso secco del substrato trattato.

Dal processo di filtrazione si riescono a recuperare 600 ml di idrolizzato il cui contenuto di solido è il 9,3% in peso pari a 55,6 g. Dal dato conferma che il processo idrolitico biocatalitico è in grado di solubilizzare oltre il 60 % in peso della crusca trattata.

In figura 4.13 sono riportate due immagini riprese al microscopio ottico, prima e dopo il trattamento idrolitico.

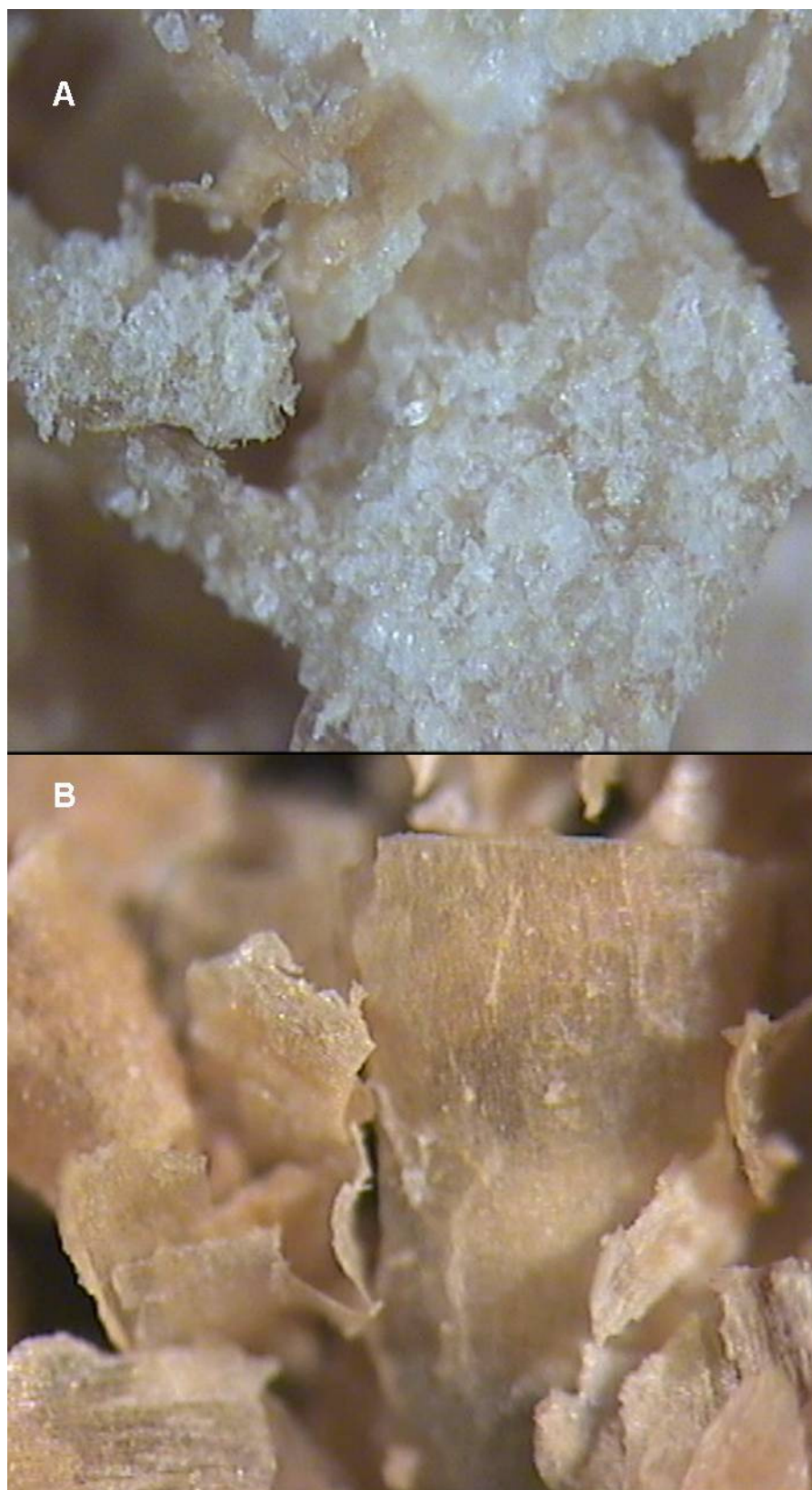


Figura 4.13.: immagini al microscopio ottico di crusca di grano (A) e residuo solido di crusca dopo trattamento idrolitico enzimatico (B).

4. Risultati e Discussione

Anche visivamente risulta molto evidente come la crusca prima del trattamento presenti un elevato contenuto di amido in cristalli traslucidi bianchi. Il trattamento biocatalitico rimuove completamente la parte amidacea “ripulendo” le strutture più compatte della crusca. Tali strutture, pericarpo esterno e strato intermedio presumibilmente, grazie all’elevato contenuto in lignina, tannini e cellulosa, sono meno aggredibili da parte dei biocatalizzatori enzimatici rimanendo in sospensione come residuo solido.

Il residuo di crusca dopo trattamento enzimatico viene sottoposta a due trattamenti, uno basico con soda 2 M al fine di idrolizzare i legami estere tra la frazione ligninica e quella saccaridica tramite *cross-link* a base di composti ferulici, e uno con acido solforico concentrato per valutare il contenuto di lignina.

Il trattamento basico consente di liberare circa 7,4 g di fenoli per Kg di residuo di crusca trattata ovvero 2,9 g di fenoli per Kg di crusca. Pertanto circa il 60 % dei fenoli estraibili dalla crusca con trattamento basico deriva dalla frazione non liquefatta tramite trattamenti biocatalitici di idrolisi. Il trattamento basico consente inoltre di solubilizzare circa il 70 % del residuo di crusca trattata, valutato tramite peso secco del residui insolubile. Valutando invece il contenuto di lignina tramite il trattamento con acido concentrato risulta un contenuto di lignina del residuo di crusca trattata pari al 30 %. E’ possibile per ciò concludere che il trattamento basico è in grado di solubilizzare completamente la frazione saccaridica ancora presente sul residuo di lavorazione del trattamento enzimatico della crusca lasciando come unico sottoprodotto la lignina (figura 4.14.). Dal confronto dell’immagine in figura 4.13. B e 4.14. si nota come il residuo dopo trattamento enzimatico sia meno traslucido e trasparente rispetto al residuo dopo trattamento con soda che appare più sottile.

4. Risultati e Discussione



Figura 4.14.: immagini al microscopio ottico di residuo solido di crusca dopo trattamento idrolitico enzimatico e trattamento con soda 2M.

4.3. Processi di estrazione della componente fenolica tramite tecnologie di adsorbimento e desorbimento su resina

Verificata la possibilità di rilasciare la componente fenolica dalla matrice vegetale tramite trattamenti biocatalitici mirati è ora necessario studiare la possibilità di sfruttare le tecnologie di estrazione con resine a scambio ionico precedentemente messe a punto presso il nostro laboratorio al fine di ottenere un estratto fenolico concentrato.

L'utilizzo di una resina scambiatrice ionica forte come l'Amberlite IRA 402 è stato testato in precedenza presso i nostri laboratori per l'estrazione della componente fenolica delle acque di vegetazione derivanti dalla produzione olearia. Tale resina è risultata molto efficace nell'estrazione di biofenoli neutri quali l'idrossitirosolo, anche se si osserva un migliore adsorbimento dei fenoli acidi come i composti cinnamici rispetto alle resine scambiatrici deboli⁷⁴. Il maggiore adsorbimento è dovuto sia ad interazioni di tipo elettrostatico ma anche alla formazione di interazioni deboli. Il rilascio degli stessi in fase di desorbimento è tuttavia sfavorita nelle resine anioniche a scambio forte. La resa complessiva del processo estrattivo risulta minore nelle resine a scambio forte per cui la scelta finale è ricaduta sulla resina a scambio debole.

Per il processo di adsorbimento abbiamo scelto la resina Amberlite IRA 95 (Rohm & Haas), costituita da una matrice copolimerica di stirene-divinilbenzene avente come gruppi funzionali delle ammine terziarie che le conferiscono il carattere di resina scambiatrice anionica debole.

Su questo tipo di resina, i polifenoli si possono adsorbire grazie a diversi tipi di interazione: interazioni ioniche fra i gruppi amminici della resina e quelli idrossilici e carbossilici dei fenoli e interazioni idrofobiche fra gli anelli aromatici dell'acido ferulico e la struttura idrofoba del copolimero stirene-divinilbenzene.

Sistema modello: acido ferulico in tampone

Si è preliminarmente verificata l'affinità della resina scambiatrice ionica debole sul solo acido ferulico, scelto come fenolo modello in quanto principale biofenolo presente nella crusca. E' necessario verificare sia quanto acido ferulico libero in soluzione la resina scelta riesce ad adsorbire, che la possibilità di estrarlo agevolmente con etanolo acido. La scelta di tale solvente deriva dalla necessità di trovare un compromesso tra efficacia di estrazione e basso impatto di processo. L'utilizzo di etanolo, solvente in grado di solubilizzare bene i fenoli e al contempo compatibile con applicazioni ad uso alimentare, risulta in prima battuta la più appropriata. L'utilizzo di acido cloridrico durante la fase estrattiva ha la doppia funzione di fornire un controione efficace alla resina in fase di dsorbimento e di stabilizzare l'estratto dal punto di vista chimico, infatti a bassi pH i fenoli risultano meno suscettibili ai processi ossidoriduttivi.

L'adsorbimento è stato effettuato in tutte le prove aggiungendo il 6% p/v di resina rispetto al volume della soluzione trattata. La tecnologia di estrazione presa in considerazione nel processo realizza il desorbimento della frazione fenolica dalla resina attraverso l'impiego di etanolo al 95% in acqua con l'1% di HCl concentrato a riflusso (75°C circa) con resina è sempre al 6% p/v in peso rispetto al volume di solvente.

Il sistema è costituito da una soluzione di 0,4 g/l di acido ferulico in tampone fosfato a pH 6 (approssimativamente lo stesso pH della crusca 1:7 in acqua dopo trattamento enzimatico). Le prove sono state svolte in batch. Sono state eseguite prove di adsorbimento anche su soluzioni di acido ferulico sulle quali era stato preliminarmente aggiunto un preparato enzimatico, cytolase PCL 5 (1% v/p) e α -amilasi (0,1% v/p), al fine di verificare la possibile influenza dei biocatalizzatori sul substrato di estrazione e sull'intero processo.

Tramite analisi dei fenoli totali viene determinata una quantità di ferulico inferiore a quella aggiunta in soluzione. Questa sottostima è probabilmente dovuta al fatto che la retta di taratura utilizzata era riferita alla catechina e non al ferulico.

Il principale interesse era quello di determinare le rese per ogni singolo step del processo di assorbimento e desorbimento ed eventuali differenze tra i campioni

4. Risultati e Discussione

trattati e non trattati enzimaticamente. Un errore sistematico dovuto ad una sottostima delle concentrazioni di fenoli ci dovrebbe consentire comunque di ottenere delle valutazioni qualitative sufficientemente affidabili sulle rese di processo.

Tabella 4.9.: Monitoraggio dei polifenoli totali nel processo di estrazione con resina per il sistema modello costituito da acido ferulico (0,4 g/l) in tampone a pH 6

fasi del processo	polifenoli totali mg/l senza enzima	Polifenoli totali mg/l Con enzima
Dopo 20 ore	305	314
Dopo adsorbimento	0	0
Dopo desorbimenti	254	250

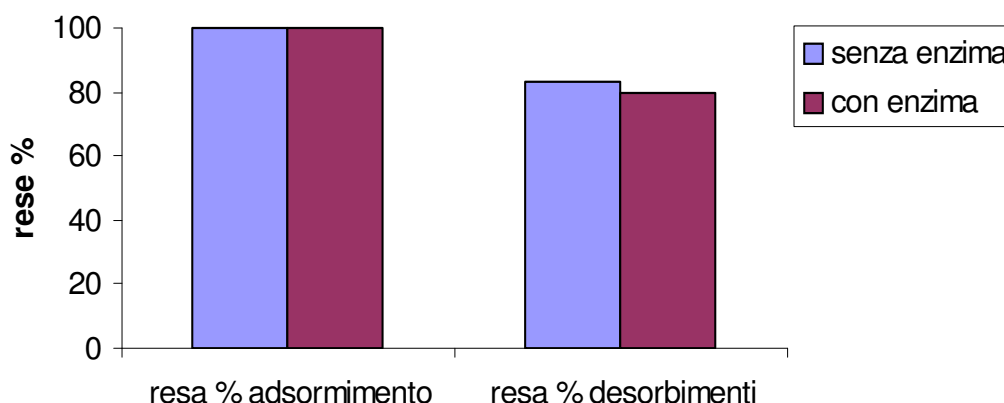


Figura 4.15.: Confronto fra rese di adsorbimento e desorbimento nel sistema modello composto da acido ferulico (0,4 g/l) in tampone a pH 6

La resina adsorbe quantitativamente l'acido ferulico in entrambi i campioni. Lo step di desorbimento consente di recuperare l'85% dell'acido ferulico dal campione non trattato enzimaticamente e circa l' 80% da quello trattato con enzima. La differenza è minima e potrebbe non essere significativa vista anche la variabilità (circa 8%) del metodo di determinazione dei fenoli totali.

Sistema modello: acido ferulico in soluzione di amido

Al fine di verificare l'influenza dei polisaccaridi presenti nell'idrolizzato di crusca sul processo di estrazione dei fenoli tramite resina, si è deciso di costruire un sistema modello che potesse mimare l'idrolizzato enzimatico ottenibile con le procedure precedentemente descritte. Su questo modello, costituito da acido ferulico (0,4 g/l) e amilosio (1 g/l), abbiamo effettuato un trattamento enzimatico per valutare l'eventuale influenza dei biocatalizzatori sul substrato di estrazione o sull'intero processo.

Si è scelto di utilizzare come substrato dell'amilosio frazione polisaccaridica presente nelle crusche, ma questo, per la sua grande capacità di coordinare acqua, a concentrazioni troppo elevate, porta ad un sistema troppo viscoso. Per questo motivo è stata utilizzata una concentrazione di amilosio in soluzione di 1 g/l seppure i trattamenti termici preliminari da noi effettuati sulla crusca rilasciano una concentrazione di carboidrati totali in soluzione superiori ai 40 g/l.

Le prove sono state effettuate in due modi: una prima prova in cui abbiamo valutato l'affinità della resina scelta per il fenolo di riferimento anche in sistemi più complessi ed una seconda prova in cui abbiamo studiato il trattamento enzimatico con cytolase PCL 5 (1% v/p) e α -amilasi (0,1% v/p) per mimare il trattamento enzimatico effettuato sul sistema reale al fini di valutare possibili perturbazioni che tale trattamento può apportare durante i processi di adsorbimento e desorbimento.

4. Risultati e Discussione

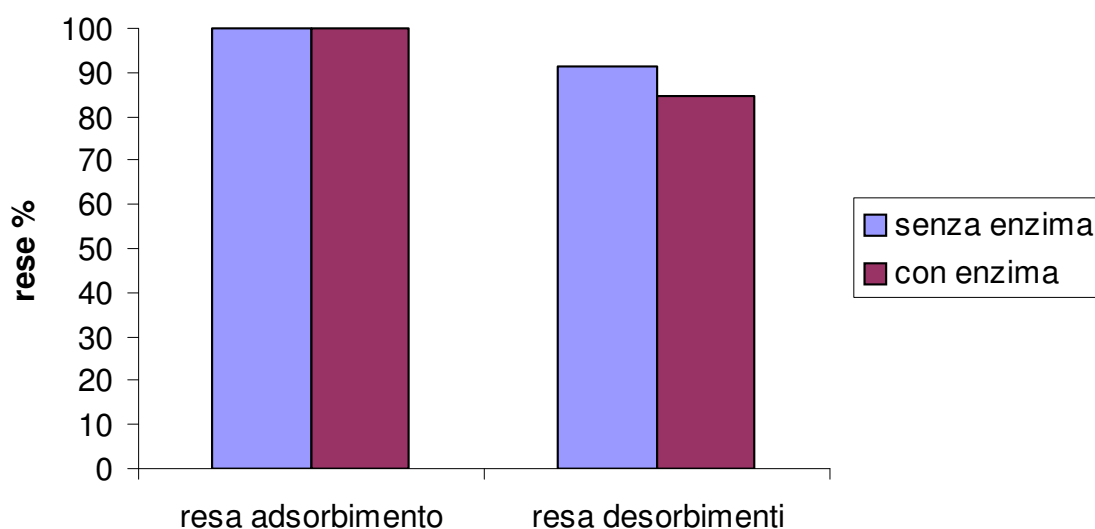


Figura 4.16.: Confronto fra rese di adsorbimento e desorbimento nel sistema modello composto da amilosio (1 g/l) e ferulico (0,4 g/l) in tampone a pH 6

Nel sistema modello contenente amilosio le rese di adsorbimento dell'acido ferulico su resina non sembrano essere influenzate dalla presenza del polisaccaride. L'acido ferulico viene quindi adsorbito in maniera quantitativa sia nel campione non trattato che nel campione contenente i preparati enzimatici.

La presenza di amidi sembra invece favorire il processo di desorbimento del fenolo dalla resina rispetto a quello che è stato osservato nel sistema modello in assenza del polisaccaride. Le rese di desorbimento sono molto elevate, addirittura superiori al 90% nel caso del campione non trattato enzimaticamente.

Sistema reale: prove preliminari

Sono effettuate delle prove di estrazione dei polifenoli solubilizzati grazie al trattamento biocatalitico enzimatico (Fungamil Super AX + Celluclast BG) precedentemente messo a punto.

Il campione si prepara nel medesimo modo visto in precedenza, una parte di crusca in sette parti di acqua in due baccini distinti, si porta in autoclave, si fa

4. Risultati e Discussione

raffreddare quindi si aggiunge l'enzima in un bath, mentre l'altro costituisce il controllo.

Il campione viene incubato in termoshaker a 30°C e 60 giri al minuto per 20 ore, trascorse queste si filtra il tutto su buchner con un filtro di nylon. Sul filtrato vengono effettuate le analisi per la determinazione dei polifenoli totali al fine di verificare l'efficienza del trattamento enzimatico.

Il filtrato è addizionato della resina IRA 95 al 6% rispetto al volume di idrolizzato quindi rimessa nel termoshake a 30°C e 60 giri al minuto per altre 20 ore. Il liquido sovrastante la resina adsorbita viene separato per decantazione e sullo stesso vengono determinati i fenoli totali ancora presenti in soluzione al fine di determinare, per differenza, la quantità adsorbita sulla resina e quindi la resa di adsorbimento del processo

La resina subisce un processo di desorbimento con etanolo acido (6% di resina p/v) a 75°C a riflusso per un'ora. Gli estratti idroalcolici opportunamente trattati sono analizzati col metodo di Folin per la determinazione dei polifenoli totali.

Le concentrazioni di fenoli totali riscontrate nei diversi campioni sono riportate in tabella 4.10.

Tabella 4.10.: concentrazione di fenoli totali in soluzione durante le diverse fasi del processo di estrazione

Polifenoli totali	senza enzima mg/l PFT	con enzima mg/l PFT
Filtrato	210	506
Adsorbiti	88	273
Desorbiti	87	262

Le rese di adsorbimento e desorbimento effettuati su campioni preparati con e senza trattamento enzimatico sono riportate in figura 4.17.

4. Risultati e Discussione

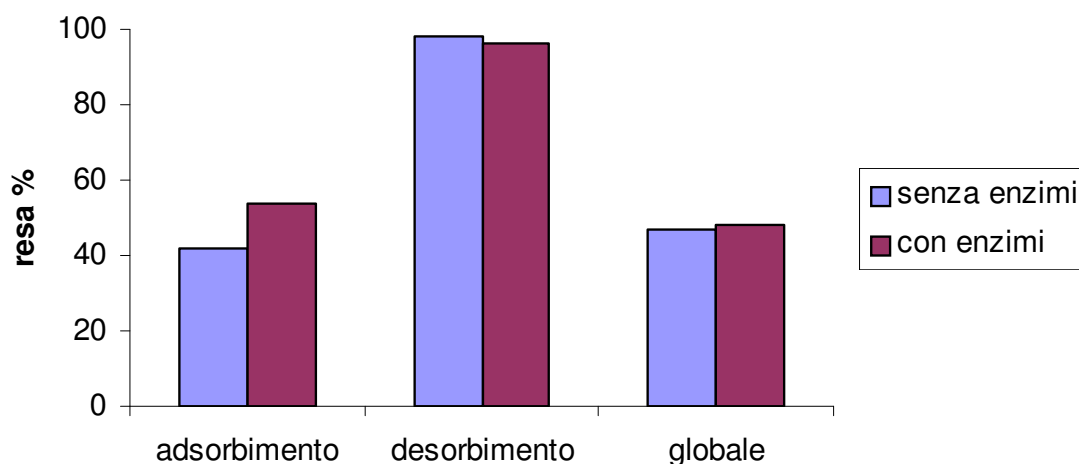


Figura 4.17.: rese preliminari del processo di estrazione di biofenoli da idrolizzati di crusca

Passando da un sistema modello ad uno reale possiamo notare un netto calo della resa di adsorbimento che, sia nel campione trattato enzimaticamente che nel campione non trattato, ha un valore inferiore al 50%. La presenza di diversi interferenti in soluzione ha ostacolato il processo di adsorbimento in maniera molto significativa.

Le rese di desorbimento della frazione fenolica restano comunque molto elevate, prossima al 100%. Il processo di desorbimento, al contrario di quello di adsorbimento, non sembra essere influenzato dalla complicazione del sistema.

Lo stadio limitante del processo di estrazione dei biofenoli da idrolizzati enzimatici tramite resine a scambio ionico debole sembra quindi essere la fase di adsorbimento. Complessivamente è possibile ad estrarre circa il 50% dei polifenoli rilasciati in soluzione dal nostro trattamento enzimatico.

La mancata resa di adsorbimento potrebbe essere imputabile all'elevata quantità di carboidrati totali presenti in soluzione sia nel campione trattato enzimaticamente che in quello non trattato. Nel sistema modello precedentemente testato l'amilosio è stato utilizzato ad una concentrazione di circa 50 volte inferiore a quella dei carboidrati totali riscontrati nell'idrolizzato. Questa semplificazione, così come le diverse specie chimiche presenti nell'idrolizzato, sono presumibilmente la causa della forte discrepanza riscontrata nelle due prove. L'elevato recupero durante la fase di desorbimento è invece

4. Risultati e Discussione

coerente con il fatto che la presenza di zuccheri riducenti favorisce il recupero dei fenoli dalla resina come dimostrato anche dal sistema modello.

Estrazione di acido ferulico tramite un processo di adsorbimento/desorbimento su resina

Al fine di meglio comprendere il processo di estrazione della componente fenolica da idrolizzati di crusca migliorandone le rese si sono effettuate ulteriori prove determinando le concentrazioni di acido ferulico tramite analisi HPLC. Inoltre si è cercato di limitare le interazioni tra la componente polisaccaridica e quella fenolica dell'idrolizzato separando la frazione in sospensione al fine di migliorare le rese estrattive che sembrano essere fortemente influenzate dalla presenza di questi composti.

L'idrolizzato di crusca ottenuto come precedentemente descritto viene sottoposto ad un processo di chiarificazione, tramite centrifugazione e filtrazione sotto vuoto su carta, al fine di allontanare la frazione polisaccaridica in sospensione. Durante le prove preliminari effettuate infatti la presenza della sospensione polisaccaridica, che nei sistemi modello non aveva creato particolari problemi, mentre comportava una forte riduzione dell'adsorbimento dell'acido ferulico su Amberlite IRA 95 risultando il principale fattore limitante le rese complessive di processo.

Su un idrolizzato chiarificato sono state effettuate prove di adsorbimento utilizzando Amberlite IRA 95 al 6% p/v di idrolizzato per 4 ore a 30°C sotto agitazione orbitale monitorando la scomparsa dell'acido ferulico in soluzione. I dati ottenuti sono riportati in Figura 4.18.

4. Risultati e Discussione

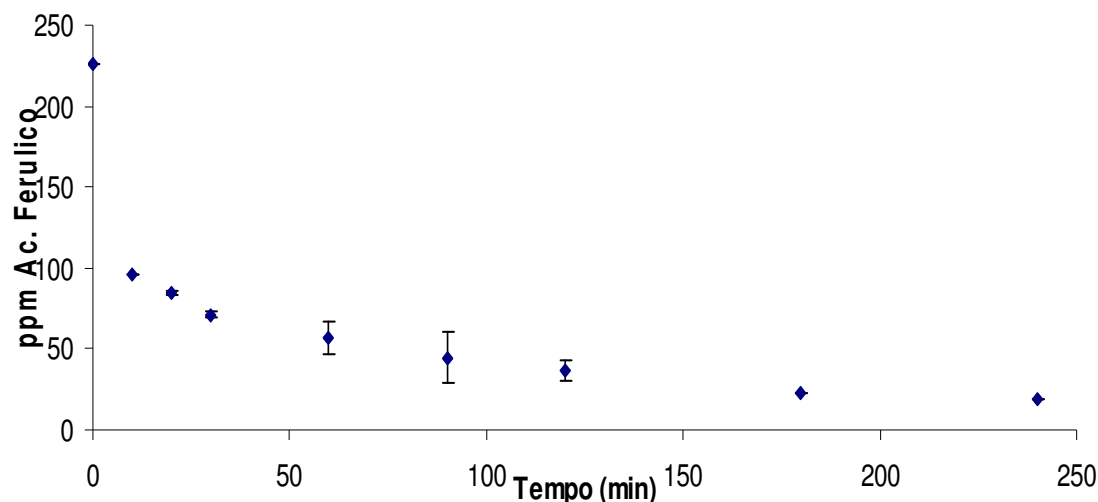


Figura 4.18.: adsorbimento di acido ferulico su resina Amberlite IRA 95 al 6% p/v da idrolizzato enzimatico di crusca chiarificato.

In un'ora la resina è in grado di estrarre circa il 75 % dell'acido ferulico presente e dopo 4 ore l'adsorbimento si aggira attorno al 90 %.

L'allontanamento della sospensione polisaccaridica, prima del processo di adsorbimento dell'acido ferulico, consente di migliorare sensibilmente le rese dal 50 al 90%.

Il processo di desorbimento della resina, una volta separata dall'idrolizzato, viene effettuata con una soluzione idroalcolica contenente etanolo in acqua 96:4 al quale viene aggiunto il 4% v/v di HCl concentrato. L'incremento della percentuale di acido cloridrico rispetto alle prove precedentemente effettuate, che prevedevano l'utilizzo di acido all'1% v/v, è dovuto al fatto che durante il processo di desorbimento si è scelto di utilizzare la resina al 25% p/v di eluente invece del 6% canonico, al fine di ridurre i volumi del processo estrattivo e l'impiego di solvente. Un aumento della concentrazione di resina di circa 4 volte deve dunque essere accompagnato da un analogo aumento della concentrazione di controione Cl^- .

Sono state quindi effettuate due estrazioni successive con resina al 25% p/v di eluente ciascuna protratta per un ora sotto agitazione orbitale a 30°C. Il secondo passaggio estrattivo è risultato essere essenzialmente un lavaggio della resina utile al fine di recuperare la porzione di eluente che non riesce ad essere sgrondato

4. Risultati e Discussione

dalla resina dopo il primo desorbimento, e di conseguenza l'acido ferulico in esso contenuto.

Il processo complessivo di desorbimento consente di recuperare il 90% dell'acido ferulico adsorbito sulla resina. L'aumento della matrice da estrarre rispetto al volume di solvente impiegato non sembra influenzare in maniera significativa le rese di estrazione dell'acido ferulico.

La riduzione degli effetti di coadsorbimento che i polisaccaridi danno con resine del tipo Amberlite è risultata la strategia vincente al fine di ottimizzare il processo estrattivo. La resa globale del processo di recupero dell'acido ferulico dall'idrolizzato è superiore al 80 % (figura 4.19.).

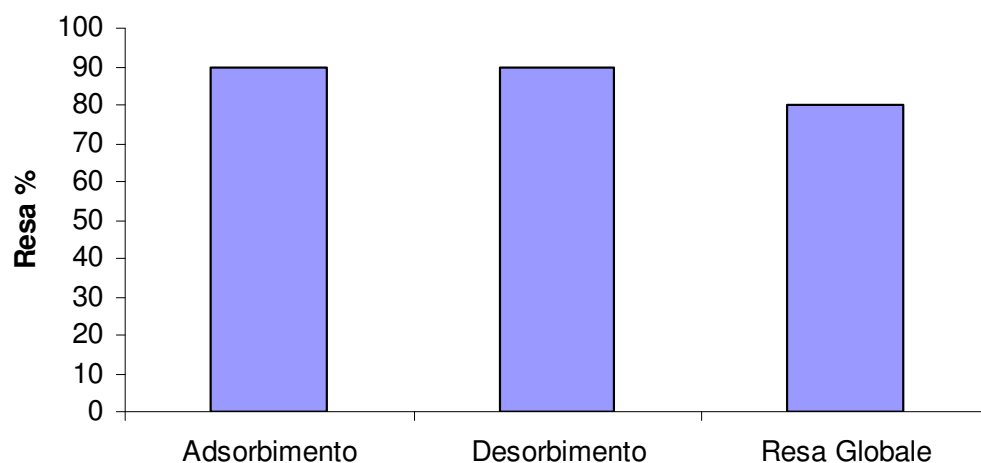


Figura 4.19.: rese del processo di estrazione di acido ferulico da idrolizzati di crusca chiarificati.

I processi di estrazione con resina non consentono di purificare la frazione fenolica se non in minima parte ma hanno il vantaggio di trasferire la frazione estratta in un solvente molto più volatile rispetto all'acqua consentendo un allontanamento e quindi una concentrazione più efficiente e meno dispendiosa. Gli estratti ottenuti infatti, dopo essere stati neutralizzati con soda e rifiltrati per allontanare il precipitato salino che si forma a causa del processo di neutralizzazione, possono essere concentrati tramite evaporazione sotto vuoto sino ad ottenere un estratto idroalcolico concentrato contenente circa 3000ppm di acido ferulico.

4.4. Produzione di biovanillina da idrolizzati di crusca contenenti acido ferulico libero

La Vanillina (4-idrossi-3-metossibenzaldeide) è uno degli aromi più importanti e largamente utilizzati nell'industria alimentare essendo il componente principale della vaniglia. La vanillina naturale estratta dalla *Vanilla plantifolia*, che comunque riesce a coprire solo meno dell'1% della domanda di mercato mondiale⁷⁵. La maggior parte della vanillina oggi presente sul mercato è ottenuta per sintesi chimica da guaiacolo o lignina⁷⁶. La produzione di vanillina per via biotecnologia attraverso la conversione microbica di substrati come l'eugenolo o l'acido ferulico rappresenta una possibile alternativa per l'ottenimento di vanillina e sta suscitando sempre maggior interesse in quanto la vanillina così prodotta potrebbe essere etichettata come "naturale" secondo le normative Europee e Statunitensi⁷⁷.

Grazie ad un finanziamento Nazionale MIUR (PRIN 2004), la possibilità di ottenere biovanillina per via fermentativa da sottoprodotti del settore agroindustriale è stata investigata da un team di ricerca composto dal Dipartimento di Chimica Applicata e Scienze dei Materiali della facoltà di Ingegneria di Bologna, dal Dipartimento di Agrobiologia e Agrochimica dell'Università di Viterbo e dal nostro gruppo. Durante questo lavoro di ricerca nei laboratori del DICASM sono stati utilizzati gli estratti di crusca da noi preparati e un ceppi mutante di *E. coli* JM109(pBB1) contenenti i geni responsabili per la conversione di acido ferulico in vanillina di *Pseudomonas fluorescens* BF13, preparato dal gruppo di Viterbo, per condurre gli esperimenti di bioconversione dell'acido ferulico in vanillina⁷⁸.

Bioconversione di acido ferulico commerciale

La capacità di JM109(pBB1) di convertire acido ferulico commerciale di grado alimentare in vanillina è stata testata risospendendo il biocatalizzatore (cresciuto in LB medium) in un tampone di conversione contenente acido ferulico 1 mM, La concentrazione tipica di un idrolizzato di crusca. Il test ha mostrato una rapida ed efficiente conversione dell'acido ferulico in vanillina. Dopo la seconda ora di bioconversione si nota la comparsa di alcol vanillico, la cui concentrazione resta però bassa entro le 4 ore di bioconversione (figura 4.20.).

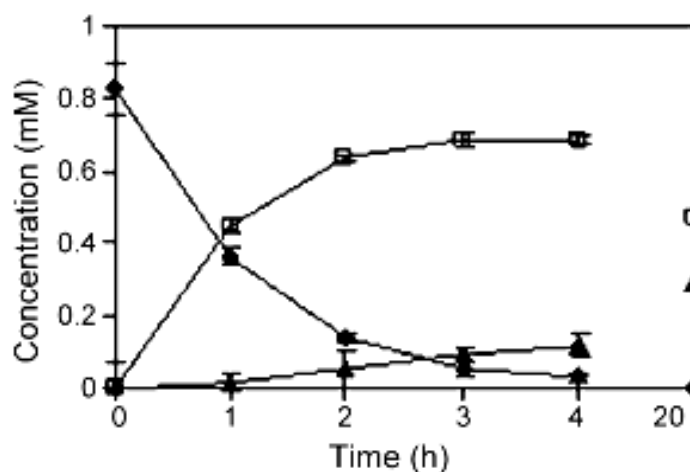


Figura 4.20.: Biotransformazione di acido ferulico alimentare (●) e produzione dei metaboliti correlati (□: vanillina, ▲: alcol vanillico) da resting cells of *E. coli* JM109(pBB1) (Da Di Gioia *et al.* 2007).

I risultati di bioconversione ottenuti sono simili a quelli precedentemente ottenuti con acido ferulico di grado analitico⁷⁹ e confermano l'efficacia del biocatalizzatore impiegato nella trasformazione del ferulico in vanillina.

Bioconversione dell' acido ferulico contenuto negli idrolizzati enzimatici di crusca

Sono state eseguite poi delle prove di bioconversione del ferulico contenuto in idrolizzati enzimatici di crusca preparati come descritto nelle sezioni precedenti, utilizzando come biocatalizzatori idrolitici Cytolase M102 1% p/p di crusca da trattare e Termamil 120L 0,1% p/p di crusca da trattare aventi una concentrazione in ferulico di 0,97 mM. Il biocatalizzatore è stato poi risospeso per le prove di conversione in media contenenti idrolizzato di crusca e tampone di bioconversione in proporzioni variabili. I dati di bioconversione ottenuti sono riportati in figura 4.21.

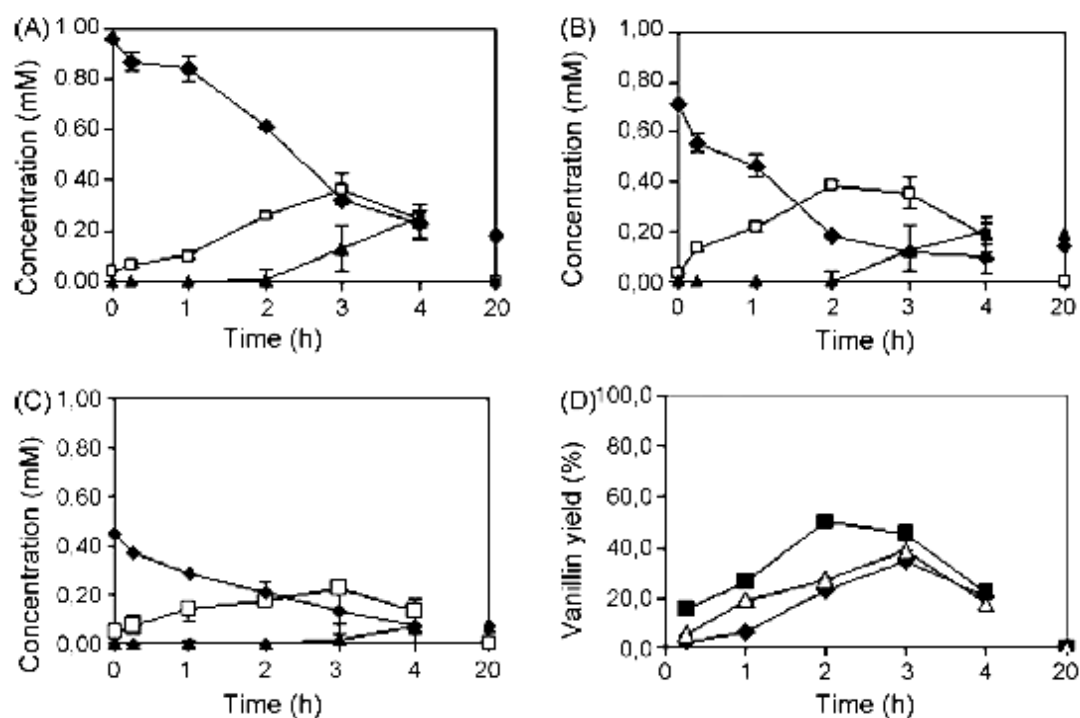


Figura 4.21.: Biotransformazione di acido ferulico (●) e produzione dei metaboliti correlati (□: vanillina, ▲: alcol vanillico) da resting cells of *E. coli* JM109(pBB1) in presenza di estratto enzimatico di crusca ottenuto con Cytolase M102 1% p/p e Termamil 120L 0,1% p/p: non diluito (A), diluito al 75% (v/v) in tampone di bioconversione a pH 7 (B), diluito al 50% (v/v) in tampone di bioconversione a pH 7 (C). (D) Resa di bioconversione in vanillina degli esperimenti effettuati con idrolizzato non diluito (▶), estratto diluito al 75% (v/v) (■), estratto diluito al 75% (v/v) (◇) (Da Di Gioia *et al.* 2007).

4. Risultati e Discussione

In tutte le condizioni la bioconversione del ferulico in vanillina avviene con rese significative, ma la concentrazione di vanillina comincia a diminuire a partire dalla terza ora di bioconversione, in concomitanza con la produzione di alcool vanillico. Le maggiori rese di bioconversione in vanillina si sono ottenute con idrolizzato di crusca diluito al 75% v/v in 2 ore di bioconversione, tale resa comincia però a scemare con la comparsa in soluzione di alcool vanillico. L'estratto non diluito ha mostrato rese analoghe a quello diluito al 75% v/v in 3 ore ma dopo tale tempo anche il contenuto di alcool vanillico e di acido ferulico erano comparabili con la concentrazione di vanillina.

Lavorando sull'idrolizzato di crusca il biocatalizzatore JM109(pBB1) ha dimostrato una minore resa di bioconversione ed una minore selettività rispetto ai test di bioconversione effettuati su acido ferulico di grado alimentare. Questi effetti indesiderati sembrano essere direttamente correlati con la concentrazione di idrolizzato nel mezzo di bioconversione. La trasformazione di aldeidi aromatiche tossiche quale è la vanillina, nei corrispondenti prodotti di riduzione è una strategia di difesa ampiamente diffusa nei ceppi di *E. coli* in grado di catabolizzare acido ferulico⁸⁰. Questo comportamento è maggiormente evidente negli esperimenti nei quali una maggior percentuale di idrolizzato enzimatico di crusca è stato impiegato come substrato di reazione ed è probabilmente dovuta alla elevata concentrazione di carboidrati contenuti nell'idrolizzato stesso. I carboidrati presenti nel mezzo di bioconversione contenente gli idrolizzati enzimatici erano sensibilmente consumati durante le prove di bioconversione. Ciò indica che le prove erano presumibilmente condotte con parte del biocatalizzatore in condizioni di crescita e questo può aver stimolato la produzione di enzimi ossidativi tra i quali probabilmente le deidrogenasi responsabili della conversione della vanillina nel corrispondente alcool.

Analoghi esperimenti sono stati condotti anche utilizzando idrolizzati enzimatici di crusca ottenuti con la stessa procedura ma impiegando biocatalizzatori diversi. Prove di bioconversione eseguite su idrolizzati di crusca ottenuti utilizzando Fungamil Super AX 1% p/p di crusca da trattare e Celluclast BG 1% p/p di crusca da trattare hanno mostrato rese di conversione del ferulico in vanillina e selettività analoghe a quelle ottenute negli esperimenti precedenti. Ciò indica che non c'è alcuna significativa influenza sul processo di bioconversione

4. Risultati e Discussione

dovuta al sistema biocatalitico enzimatico utilizzato per ottenere gli idrolizzati di crusca contenenti acido ferulico libero.

Bioconversione dell' acido ferulico contenuto in estratti concentrati ottenuti tramite estrazione con resina IRA 95 da idrolizzati enzimatici di crusca

Al fine di incrementare le rese e le selettività del processo di bioconversione dell'acido ferulico in vanillina si è deciso di utilizzare come prodotto di partenza per la bioconversione l'estratto idrolacoolico derivante dai processi di estrazione della frazione fenolica contenuta negli idrolizzati enzimatici di crusca basati su processi di adsorbimento e desorbimento su resine polimeriche del tipo IRA 95, come descritto nei paragrafi precedenti. Tale processo di estrazione consente di ottenere una soluzione contenente il 28% degli zuccheri riducenti presenti nell'idrolizzato enzimatico, ed una concentrazione in ferulico circa 13 mM. L'impiego di tale preparato consente di limitare il problema dell'aggiunta di substrato di crescita per il biocatalizzatore in concomitanza col substrato per la bioconversione. I risultati ottenuti durante gli esperimenti di bioconversione dell'acido ferulico da estratto purificato di crusca, sono riportati in figura 4.22.

4. Risultati e Discussione

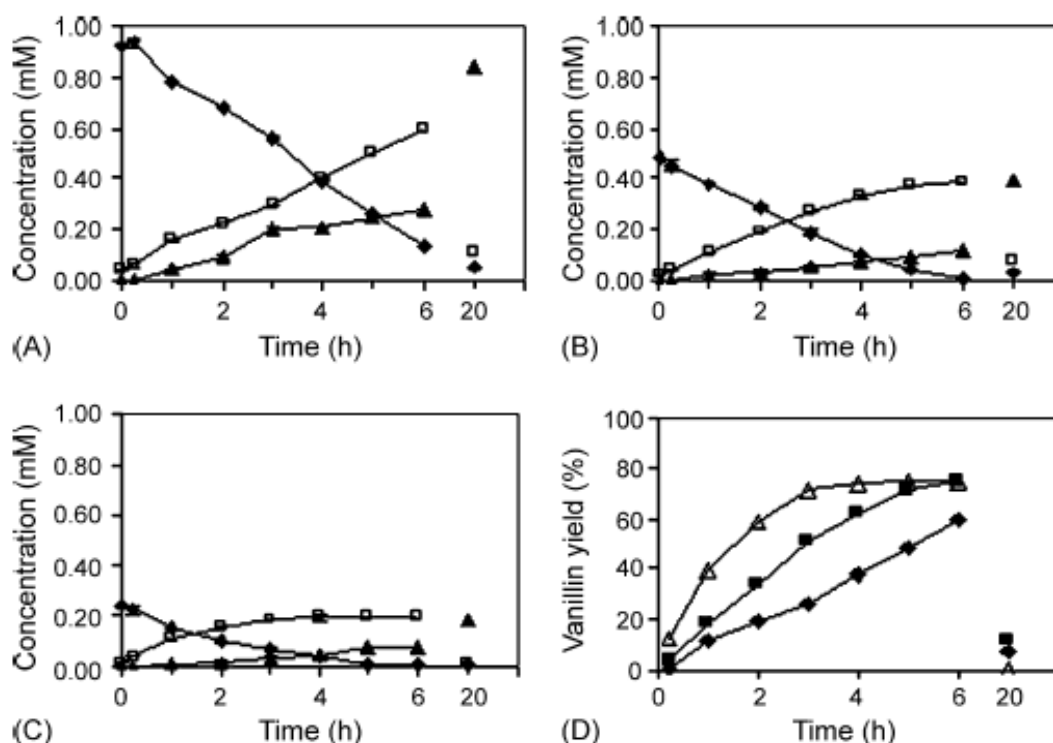


Figura 4.22.: Biotransformazione di acido ferulico (●) e produzione dei metaboliti correlati (□: vanillina, ▲: alcol vanillico) da resting cells of *E. coli* JM109(pBB1) in presenza di estratto enzimatico di crusca concentrato tramite tecnologia a resina Amberlite IRA 95 alla concentrazione in tampone di bioconversione di: 1 mM (A), 0,5 mM (B), 0,25 mM (C). (D) Resa di bioconversione in vanillina degli esperimenti effettuati 1mM (▶), 0,5 mM (■), 0,25 mM (◇) (Da Di Gioia *et al.* 2007).

In tutti gli esperimenti condotti sono state ottenute rese di bioconversione comprese tra il 60-70 % in 5-6 ore di bioconversione. La purificazione dell'idrolizzato enzimatico di crusca tramite tecnologia a resina consente di ottenere maggiori rese di bioconversione in vanillina e una minore riduzione ad alcool vanillico rispetto a quanto osservato utilizzando direttamente l'idrolizzato enzimatico come substrato di bioconversione. Questi dati supportano l'ipotesi che i carboidrati abbiano un effetto negativo sulla bioconversione dell'acido ferulico in vanillina.

La massima concentrazione di vanillina ottenuta con questi esperimenti risulta comunque minore rispetto a quanto ottenuto utilizzando acido ferulico di grado alimentare utilizzando lo stesso biocatalizzatore o utilizzando biocatalizzatori diversi riportati in letteratura^{62,81}. Tuttavia rese di bioconversione simili sono state riportate da Shin *et al.*⁸² utilizzando un ceppo di *Streptomyces* per bioconvertire acido ferulico (1 mM) estratto tramite solventi da idrolizzati di fibra di mais.

5. CONCLUSIONI

Il presente lavoro di ricerca è stato incentrato attorno allo sviluppo di tecnologie di idrolisi enzimatica della crusca di grano duro e di recupero della frazione fenolica in essa contenuta al fine di sviluppare tecnologie di *biorefining* per il recupero di *secondary chemical building blocks* da matrici rinnovabili ampiamente disponibili quali gli scarti dell'agroindustria.

Tra i trattamenti idrolitici chimici quello effettuato con soda 1M è risultato essere il più efficiente nel solubilizzare la frazione pentosanica. Un effetto determinante è dato dal pretrattamento termico a 121°C che favorisce la disgregazione della matrice vegetale. Tramite trattamento termico-basico è possibile estrarre pentosani pari al 15 % del peso della crusca trattata.

Il processo di idrolisi enzimatica effettuato utilizzando due preparati commerciali su crusca pretrattata termicamente consente di ottenere estrazioni di pentosani fino all' 11 % del peso della crusca trattata.

È stato determinato il rapporto crusca acqua (1:7) ottimale per il processo di idrolisi. Tale rapporto oltre che per l'estrazione dei pentosani risulta ottimale anche per l'idrolisi e la solubilizzazione dei biofenoli presenti nella crusca.

Tramite idrolisi chimica è possibile ottenere estratti contenenti fino a 0,44 g/l di biofenoli, pari ad un'estrazione del 50 % del contenuto in fenoli della crusca. Tali estratti hanno mostrato un potere antiossidante pari a 245 TE/L.

Sono stati caratterizzati alcuni preparati enzimatici commerciali valutando le loro potenzialità sia come agenti destrutturati per la matrice vegetale sia per la capacità di idrolizzare specificamente i legami estere che l'acido ferulico instaura con residui delle catene polisaccaridiche. È stato osservato che spesso le attività preponderanti che caratterizzano un preparato non sono in realtà quelle per le quali il preparato stesso viene commercializzato. Da ciò deriva la necessità di caratterizzare accuratamente i biocatalizzatori da impiegare per finalità specifiche indipendentemente da quanto riportato nelle schede tecniche del produttore e dunque di sviluppare metodologie analitiche *ad hoc*.

5. Conclusioni

E' stata valutata la capacita dei biocatalizzatori di rilasciare acido ferulico dalla crusca risospesa in acqua e pretrattata termicamente. L'efficienza dei singoli preparati è innanzitutto legata alla presenza di attività arilesterasiche. L'assenza di tali attività rende il preparato incapace di rilasciare acido ferulico in soluzione. E' stato inoltre osservato come l'efficacia del preparato commerciale Fungamil Super AX sia la migliore, tra quelli presi in considerazione, sia in termini di rese che di velocità nonostante la sua attività arilesterasica non sia la più elevata. Ciò lascia supporre che una elevata attività amilasica, agisca in maniera sinergica con le arilesterasi favorendo il rilascio di acido ferulico.

Valutando poi l'utilizzo in combinazione di più preparati è stato osservato che non vi sono spiccati effetti additivi per quanto riguarda le attività arilesterasiche. I risultati migliori in termini di rilascio di acido ferulico si sono avuti accoppiando preparati con elevate attività arilesterasiche a preparati dalle spiccate caratteristiche destrutturanti di liquefazione della matrice e tra questi la combinazione più efficace è risultata essere quella composta da Fungamil Super AX e Celluclast BG che consente di solubilizzare circa il 60 % in peso della crusca trattata.

Con il biocatalizzatore scelto è stato poi monitorato il rilascio di ferulico in soluzione durante il trattamento. È stato osservato che già dopo 3 ore di trattamento oltre il 90% dell'acido ferulico solubilizzabile per via biocatalitica era stato liberato.

Sono state testate le tecnologie estrattive messe a punto presso il nostro laboratorio per l'estrazione di biofenoli dalle acque di vegetazione delle olive sugli idrolizzati enzimatici di crusca. Su sistemi modello contenenti acido ferulico e amilosio l'estrazione tramite adsorbimento su resina a scambio anionico debole IRA 95 seguita da desorbimento con etanolo acido hanno dato rese globali di estrazione prossime al 90%. Prove preliminari effettuate su un idrolizzato enzimatico di crusca hanno consentito di estrarre circa il 40 % del contenuto in biofenoli dell'idrolizzato.

L'idrolizzato è stato successivamente chiarificato al fine di allontanare la sospensione lattiginosa di polisaccaridi per essere sottoposto ad un processo di estrazione dell'acido ferulico su Amberlite IRA 95. Tale operazione si è resa

5. Conclusioni

necessaria in quanto durante prove preliminari era stato osservata una bassa efficienza del processo, soprattutto in fase adsorbimento, attribuita proprio alla presenza di fenomeni di coadsorbimento dei polisaccaridi sulla resina.

Sia il processo di adsorbimento che quello di desorbimento, effettuati sull'idrolizzato chiarificato, hanno mostrato rese superiori al 90%, con una resa complessiva di recupero dell'acido ferulico dall'idrolizzato di oltre l'80%.

Infine è stato dimostrato che gli estratti purificati di acido ferulico ottenuti tramite processi di idrolisi enzimatica della crusca seguiti da step di estrazione tramite tecnologie di adsorbimento e desorbimento della frazione fenolica su resine a scambio ionico Amberlite IRA 95 possono essere utilizzati come secondary chemical building blocks in processi di biotrasformazione per l'ottenimento di prodotti ad elevato valore aggiunto. Sono infatti stati condotti esperimenti di bioconversione degli estratti purificati di biofenoli derivanti da crusca per l'ottenimento di vanillina utilizzando un ceppo di *E. coli* JM109(pBB1) contenenti i geni responsabili per la conversione di acido ferulico in vanillina di *Pseudomonas fluorescens* BF13. I risultati ottenuti hanno mostrato che un prodotto ad elevato valore aggiunto come la biovanillina, può essere ottenuto con interessanti rese (60-70%) e velocità (5-6h) di bioconversione a partire da un sottoprodotto dell'agroindustria largamente diffuso come la crusca di grano.

In Figura 5.1. è mostrato uno schema riassuntivo del processo studiato con relativi bilanci di massa e rese di solubilizzazione ed estrazione dell'acido ferulico contenuto nella crusca di grano in vanillina nonché del processo di bioconversione in vanillina.

5. Conclusioni

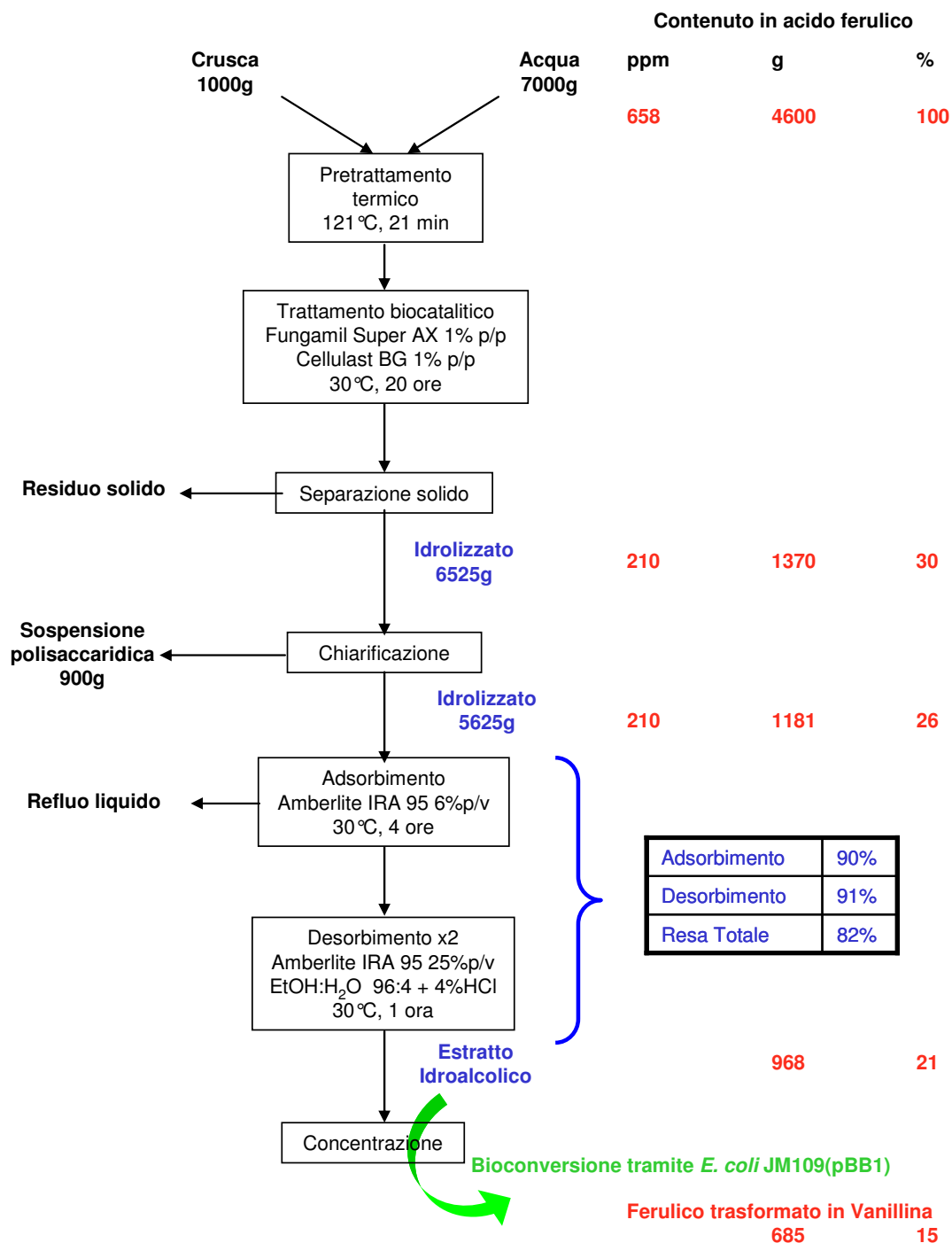


Figura 5.1: Schema riassuntivo del processo di solubilizzazione e recupero di acido ferulico da crusca e bioconversione in vanillina.

6. SVILUPPI FUTURI

Al fine di ottimizzare i parametri del processo di estrazione della componente fenolica dalle crusche, sarà necessario ottimizzare le rese del processo idrolitico enzimatico. Lo stadio limitante sembra infatti essere correlato all'inibizione da prodotto sul biocatalizzatore. Al fine di migliorare le prestazioni di processo verranno condotti esperimenti di separazione di diverse frazioni (alto peso – enzimi – basso peso) al fine di recuperare il catalizzatore per riutilizzarlo sulla matrice ad alto peso e limitare le inibizioni migliorando la resa in fenoli solubili. Tale strategia dovrebbe inoltre consentire di ottenere idrolizzati privi di polisaccaridi ad alto peso molecolare consentendo per ciò miglioramenti anche nei processi estrattivi basati su resina.

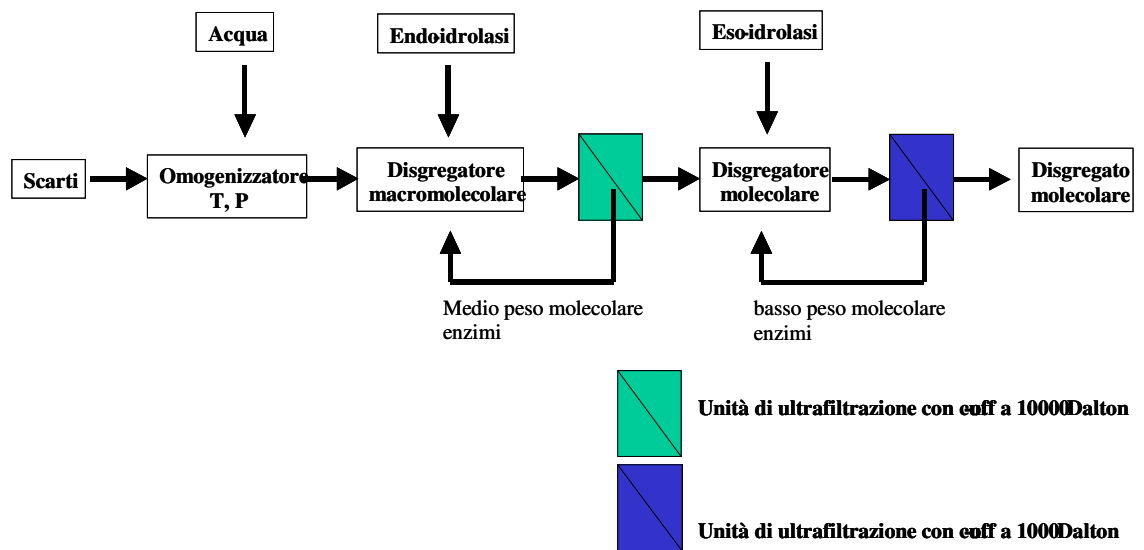


Figura 6.1: Schema per l'implementazione del processo di idrolisi enzimatica di crusche di garno tramite separazione di diverse frazioni (alto peso – enzimi – basso peso)

7. BIBLIOGRAFIA

-
- ¹ Carovita G., Giliberto J., Eco-energia:avanza la ricerca sul dopo-petrolio, “Il Sole 24 Ore”, supplemento del 16/12/2004
- ² Malpeli F., “I Sistemi di gestione ambientale: certificazioni ISO 14001 e registrazioni emas”, *Ingegneria Sanitaria ambientale* 2002/2003
- ³ Achterholt S, Priefert H, Steinbüchel A. 2000. Identification of *Amycolatopsis* sp. strain HR167 genes, involved in the bioconversion of ferulic acid to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:799-807
- ⁴ US Patent n° 6,869,974 B1.
- ⁵ Tae Ho Kim, Chang Gi Han and Chung Kun Song, (2008), “Instability of threshold voltage under constant bias stress in pentacene thin film transistors employing polyvinylphenol gate dielectric”, *Thin Solid Films*, 516, 6, 1232-1236.
- ⁶ Grassi G. e Bridwater A.V. (1990) Biomass for energy and environmental, agriculture and industry in Europe – A strategy for the future. Commission of the European Communities.
- ⁷ The State of Food and Agriculture, FAO report (2005)
- ⁸ Dati ISTAT: www.istat.it
- ⁹ Di Blasi C., Tanzi V. e Lanzetta M. (1997) A study on the production of agricultural residues in Italy. *Biomass and Bioenergy*, 12, 321-331
- ¹⁰ <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/plants/plantmodel.html>
- ¹¹ K.J. Johnson, B.J. Jones, C.J. Shultz, A. Babic, “Non enzymatic cell wall (glycol) protein” , in *THE PLANT CELL WALL Annual Plant Reviews, Vol. 8* pp.111-143, 2003.
- ¹² Craig B. Faulds, “Ferulic acid esterases from *Aspergillus niger*: their application in the biotransformation of agricultural residues”, PhD Thesis, University of East Anglia, 1997
- ¹³ S. Vorwerk, S. Somerville, C. Somerville; “The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance” *Trends in plant science*, 9, 203-209, 2004.

7. Bibliografia

-
- ¹⁴ Rohit Sharma, Yusuf Chisti, Uttam Chand Banerjee, “Production, purification, characterization, and applications of lipases”, *Biotechnology Advances*, 19, 627–662, 2001
- ¹⁵ Han-Gyol Shin, Young-Min Choi, Ho-Kyoung Kim, Youn-Chul Ryu, Sang-Hoon Lee, Byoung-Chul Kim, “Tenderization and fragmentation of myofibrillar proteins in bovine *longissimus dorsi* muscle using proteolytic extract from *Sarcodon aspratu*”s, Article in Press, doi:10.1016/j.lwt.2007.08.019.
- ¹⁶ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.4
- ¹⁷ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.78
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.8
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.151
- ¹⁸ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ¹⁹ Ranveer Singh Jayani, Shivalika Saxena, Reena Gupta, Microbial pectinolytic enzymes: A review, *Process Biochemistry*, 40 2931–2944, 2005
- ²⁰ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ²¹ Carloni F., “Valorizzazione degli scarti dell’industria olearia tramite il recupero di sostanze fenoliche e la produzione di alcool etilico per via fermentative”, *Tesi di Laurea in Chimica Industriale*, Università di Bologna, 2003-2004
- ²² Crepin, V.F., Faulds, C.B., Connerton, I.F., “Functional classification of the microbial feruloyl esterases”. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 647–652, 2004.
- ²³ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.15
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.2.1.11
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=4.2.2.10
- ²⁴ http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.4.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.5.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.10.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.2.1.
http://www.brenda-enzymes.info/php/result_flat.php4?ecno=3.4.4.1.

-
- ²⁵ Daghetta A. , Gli alimenti. Aspetti tecnologici e nutrizionali
- ²⁶ Benamrouche S., Crônier D., Debeire P., Chabbert B., A chemical and histological study on the effect of (1→4)-β-xylanase treatment on wheat bran, *Journal of Cereal Science* 36, 253-260, 2002
- ²⁷ Saulniet L. , Marot C., Chanliaud E., Thibault J-F., Cell wall polysaccharide interactions in maize bran, *Carbohydrate Polymers* 26, 279-287, 1995
- ²⁸ Lequart C., Nuzillard J-M., Kurek B., Debeire P., Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides, *Carbohydrate Research* 319, 102-111, 1999
- ²⁹ Faulds C.B., Zanichelli D., Crepin V.F., Connerton I.F., Juge N., Bhat M.K., Waldron K.W., Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase, *Journal of Cereal Science* 38, 281-288, 2003
- ³⁰ Cereals and Cereals Products, *Food Chemistry* 15, 631-692
- ³¹ Molitura dei cerali, pastificazione e panificazione, in *Conservazione e trasformazione degli alimenti*. Giannetto Nicolai, Hoepli, 326-361.
- ³² C. Antoine, S. Peyron, F. Mabilie, C. Lapierre, B. Bouchet, J. Abecassis and X. Rouau, “Individual contribution of grain outer layers and their cell wall structure to the mechanical properties of wheat bran”, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2026–2033, 2003.
- ³³ M.L. Parker, A. Ng and K.W. Waldron, “The phenolic acid and polysaccharide composition of cell walls of bran layers of mature wheat (*Triticum aestivum* L. cv. Avalon) grains”, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2539–2547, 2005.
- ³⁴ C. Barron, A. Surget and X. Rouau, “Relative amounts of tissues in mature wheat (*Triticum aestivum* L.) grain and their carbohydrate and phenolic acid composition”, *Journal of Cereal Science*, 45, 88-96, 2007.
- ³⁵ S. Benamrouche, D. Crônier, P. Debeire and B. Chabbert, “A chemical and histological study on the effect of (1-4)-β-endo-xylanase treatment on wheat bran”, *Journal of Cereal Science*, 36, 253–260, 2002.

-
- ³⁶ C. Antoine, S. Peyron, V. Lullien-Pellerin, J. Abecassis and X. Rouau, “Wheat bran tissue fractionation using biochemical markers”, *Journal of Cereal Science*, 39, 387–393, 2004.
- ³⁷ D.I. Rhodes, M. Sadek and B.A. Stone, “Hydroxycinnamic acids in walls of wheat aleurone cells”, *Journal of Cereal Science*, 36, 67–81, 2002.
- ³⁸ Iiyama, K., Lam, T.B.T., Stone, B.A., “Phenolic acid bridges between polysaccharides and lignin in wheat internodes”, *Phytochemistry*, 29, 733–737, 1990.
- ³⁹ C.A. Rice-Evans, N.J. Miller, and G. Paganga, 1995, “Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids”, *Free Radical Biology & Medicine*, 20, 933-956.
- ⁴⁰ R.W. Owen, A. Giacosa, W.E. Hull, R. Haubner, B. Spiegelhalder, H. Bartsch, 2000, “The antioxidant/anticancer potential of phenolic compound isolated from olive oil”, *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- ⁴¹ Craig B. Faulds, Begona Bartolomé, Gary Williamson, 1996, “Novel biotransformations of agro-industrial cereal waste by ferulic acid esterases”, *Industrial Crops and Products*, 6, 367-374
- ⁴² Liangli (Lucy) Yu, Kequan Zhou, John W Parry, 2005, “Inhibitory effects of wheat bran extracts on human LDL oxidation and free radicals”, *LWT*, 38, 463–470
- ⁴³ Zhaohui Zhang, Taotao Wei, Jingwu Hou, Gengshan Lia, Shaozu Yu, Wenjuan Xin, 2003, “Iron-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: attenuation by tetramethylpyrazine and ferulic acid”, *European Journal of Pharmacology*, 467, 41–47.
- ⁴⁴ Aimin Wen, Pascal Delaquis, Kareen Stanich, Peter Toivonen, 2003, “Antilisterial activity of selected phenolic acids”, *Food Microbiology*, 20, 305–311.
- ⁴⁵ Antonella Saija, Antonio Tomaino, Domenico Trombetta, Anna De Pasquale, Nicola Uccella, Tony Barbuzzi, Donatella Paolino, Francesco Bonina, “In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents”, *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 39–47.

7. Bibliografia

-
- ⁴⁶ Rong-Liang Zheng and Hong Zhang, 1997, "Effects of ferulic acid on fertile and asthenozoospermic infertile human sperm motility, viability, lipid peroxidation, and cyclic nucleotides", *Free Radical Biology & Medicine*, 22, 581–586.
- ⁴⁷ Atsushi Suzuki, Daiji Kagawa, Akihiko Fujii, Ryuji Ochiai, Ichiro Tokimitsu, and Ikuo Saito, "Short- and Long-Term Effects of Ferulic Acid on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats", *AJH*, 15, 351–357, 2002.
- ⁴⁸ Yong-Zhong Hou, Jie Yang, Guang-Rong Zhao, Ying-Jin Yuan, "Ferulic acid inhibits vascular smooth muscle cell proliferation induced by angiotensin II", *European Journal of Pharmacology*, 499, 85–90, 2004
- ⁴⁹ Shinya Sakai, Hiroshi Ochiai, Katsuhisa Nakajima, Katsutoshi Terasawa, "Inhibitory effect of ferulic acid on macrophage inflammatory protein-2 production in a murine macrophage cell line raw264.7", *CYTOKINE*, 9, 242-248, 1997.
- ⁵⁰ Tateo F., Sfarinati di frumento, *Analisi dei prodotti alimentari*
- ⁵¹ Chaplin M.F., Kennedy J.F., Colorimetric assay, *Carbohydrate analysis*, 1986
- ⁵² Mecozzi M., Acquistucci R., Amici M, Cardilli D., Improvement of an ultrasound assisted method for the analysis of total carbohydrate in environmental and food samples, *Ultrasonics Sonochemistry* 9, 219-223, 2002
- ⁵³ Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K., Rebers P.A., Smith F., Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances, Division of Biochemistry, University of Minnesota
- ⁵⁴ Douglas S.G., A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour, *Food Chemistry* 7, 139-145, 1981
- ⁵⁵ Bailey M.J., Biely P., Poutanen K., "Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity", *Journal of Biotechnology*, 23, 257-270, 1992
- ⁵⁶ Russo S.F. & Moothart L., "Kinetic study of the enzyme lactase", *Journal of Chemical Education*, 242-243, 1977
- ⁵⁷ Giuliani S., (1996-'97) "Studio della produzione di laccasi da *Pleurotus ostreatus* in sistemi modello di acque di vegetazione", Tesi di Laurea in Chimica Industriale, Università di Bologna

-
- ⁵⁸ Setti L., Giuliani S., Spinozzi G., Pifferi P.G., “Laccase catalyzed-oxidative coupling of 3-methyl 2-benzothiazolinone hydrazide and methoxyphenols”, *Enzyme and microbial technology*, 25, 258-289, 1999
- ⁵⁹ Di Stefano, Cravero, Gentilini, Vignevini, 1/ 2, 47-52, 1998
- ⁶⁰ Donglin Zhang, Yasunori Hamauzu, “Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and its antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking”, *Food Chemistry*, 88, 503-509, 2004.
- ⁶¹ Andrew J. Jay, Mary L. Parker, Richard Faulks, Fiona Husband, Peter Wilde, Andrew C. Smith, Craig B. Faulds, Keith W. Waldron, “A systematic micro-dissection of brewers’ spent grain”, *Journal of Cereal Science*, 47, 357–364, 2008
- ⁶² Soni S.K., Kaur A., Gupta J.K., “A solid state fermentation based bacterial α -amylase and fungal glucoamylase system and its suitability for the hydrolysis of wheat starch”, *Process Biochemistry* 39, 185-192, 2003
- ⁶³ Lequart C., Nuzillard J-M., Kurek B., Debeire P., “Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides”, *Carbohydrate Research* 319, 102-111, 1999
- ⁶⁴ Faulds C.B., Zanichelli D., Crepin V.F., Connerton I.F., Juge N., Bhat M.K., Waldron K.W., “Specificity of feruloyl esterases for water-extractable and water-unextractable feruloylated polysaccharides: influence of xylanase”, *Journal of Cereal Science* 38, 281-288, 2003
- ⁶⁵ Helena Pala, Manuel Mota, Francisco Miguel Gama, “Enzymatic depolymerisation of cellulose”, *Carbohydrate Polymers*, 68, 101–108, 2007
- ⁶⁶ Y.D. Hang, E.E. Woodams, “Xylanolytic activity of commercial fruit-processing enzyme preparations”, *Letters in Applied Microbiology*, 24, 389-391, 1997.
- ⁶⁷ G.D. Haki, S.K. Rakshit, “Developments in industrially important thermostable enzymes: a review”, *Bioresource Technology*, 89 17–34, 2003.
- ⁶⁸ R. Renuka Devi, C. Arumugan, “Antiradical efficacy of phytochemical extracts from defatted rice bran”, *Food and Chemical Toxicology*, 45, 2014–2021, 2007.

-
- ⁶⁹ Theodora-Ioanna Lafka, Vassilia Sinanoglou, Evangelos S. Lazos, “On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes”, *Food Chemistry*, 104, 1206–1214, 2007
- ⁷⁰ Y Sakihama, M F Cohen, S C Grace, H Yamasaki, “Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants”, *Toxicology*, 177, 67–80, 2002
- ⁷¹ P.A. Caballero, M. Gomez, C.M. Rosell, “Improvement of dough rheology, bread quality and bread shelf-life by enzymes combination”, *Journal of Food Engineering*, 81, 42–53, 2007
- ⁷² O. Munoz, M. Sepulveda, M. Schwartz, “Effects of enzymatic treatment on anthocyanic pigments from grapes skin from chilean wine”, *Food Chemistry*, 87, 487–490, 2004.
- ⁷³ Wood, T. M., & Bhat, K. M., “Methods for measuring cellulase activities. Methods in Enzymology”, 160, 87–112 1988
- ⁷⁴ Carloni Francesco, “Valorizzazione degli scarti dell’industria olearia tramite il recupero di sostanze fenoliche e la produzione di alcool etilico per via fermentative”, *Tesi di Laurea in Chimica Industriale Università di Bologna*, 2003-2004
- ⁷⁵ Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A. “Biotechnological production of vanillin”, *Appl Microbiol Biotechnol*;56:296–314, 2001
- ⁷⁶ Ramachandra Rao S, Ravishankar GA. “Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes”, *J Sci Food Agric*, 80:289–304, 2000
- ⁷⁷ Krings U, Berger RG, “Biotechnological production of flavours and fragrances”, *Appl Microbiol Biotechnol*, 49:1–8, 1998
- ⁷⁸ Diana Di Gioia, Luigi Sciubba, Leonardo Setti, Francesca Luziatelli, Maurizio Ruzzi, Dario Zanichelli and Fabio Fava, , “Production of biovanillin from wheat bran”, *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 598-505, 2007
- ⁷⁹ Barghini P, Di Gioia D, Fava F, Ruzzi M., “Vanillin production using metabolically engineered *Escherichia coli* under non-growing conditions”, *MicrobCell Fact*, 6:13, 2007

7. Bibliografia

-
- ⁸⁰ Overhage J, Steinbuchel A, Priefert H., “Highly efficient biotransformation of eugenol to ferulic acid and further conversion to vanillin in recombinant strain of *Escherichia coli*”, *Appl Environ Microbiol*,;69:6569–76, 2003
- ⁸¹ Yoon SH, Li C, Lee SH, Yoon JY, Choi MS, Seo WT, “Production of vanillin by metabolically engineered *Escherichia coli*.”, *Biotechnol Lett*,;27:1829–32., 2005
- ⁸² Shin HD, McClendon S, Le T, Taylor F, Chen RR., “A complete enzymatic recovery of ferulic acid from corn residues with extracellular enzymes from *Neosartorya spinosa* NRRL185”, *Biotechnol Bioeng*, 95, 1108–15, 2006